

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992601 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.03

(22) Дата подачи заявки
2018.04.30

(51) Int. Cl. C07D 471/04 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(54) КОНДЕНСИРОВАННОЕ ИМИДАЗОПИПЕРИДИНОВОЕ СОЕДИНЕНИЕ,
ЯВЛЯЮЩЕЕСЯ ИНГИБИТОРОМ JAK

(31) 62/492,574

(32) 2017.05.01

(33) US

(86) PCT/US2018/030148

(87) WO 2018/204238 2018.11.08

(71) Заявитель:

ТЕРЕВАНС БАЙОФАРМА Ар энд Ди
АйПи, ЭлЭлСи (US)

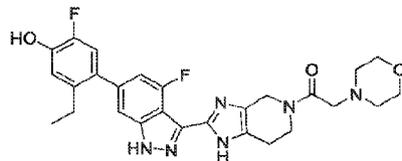
(72) Изобретатель:

Фазери Пол Р., Дзян Лань,
Маккиннелл Роберт Мюррей,
Таллади Венкат Р., Чжан Хао, Дэброс
Марта, Нзерем Джерри, Бенджамин
Ноа, Клайншек Мелани А., Крейтер
Гленн Д. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение представляет соединение формулы (1) или его фармацевтически приемлемую соль, полезные в качестве ингибитора JAK. Изобретение также представляет кристаллические формы соединения, фармацевтические композиции, содержащие такое соединение, способы применения соединения для лечения заболеваний, поддающихся лечению ингибитором JAK, и способы и промежуточные соединения, полезные для получения такого соединения.



(1)

A1

201992601

201992601

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420–559013ЕА/025

КОНДЕНСИРОВАННОЕ ИМИДАЗО–ПИПЕРИДИНОВОЕ СОЕДИНЕНИЕ, ЯВЛЯЮЩЕЕСЯ ИНГИБИТОРОМ JAK

Предпосылки создания изобретения

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение направлено на соединение, являющееся ингибитором JAK киназы, которое полезно для лечения различных заболеваний, в частности глазных, кожных и респираторных заболеваний. Изобретение также направлено на кристаллические формы соединения, фармацевтические композиции, содержащие такое соединение, способы применения такого соединения для лечения заболеваний, поддающихся лечению ингибитором JAK, и способы и промежуточные соединения, полезные для получения такого соединения.

Предшествующий уровень техники

Цитокины являются межклеточными сигнальными молекулами, которые включают хемокины, интерфероны, интерлейкины, лимфокины и фактор некроза опухоли. Цитокины имеют решающее значение для нормального роста клеток и иммунорегуляции, но также стимулируют иммуноопосредованные заболевания и способствуют росту злокачественных клеток. Повышенные уровни многих цитокинов вовлечены в патологию большого количества различных заболеваний или состояний, особенно тех заболеваний, которые характеризуются воспалением. Многие из цитокинов, связанных с заболеванием, действуют через сигнальные пути, зависящие от Janus семейства тирозинкиназ (JAK), которые передают сигналы через семейство транскрипционных факторов переносчиков сигнала и активаторов транскрипции (STAT).

Семейство JAK включает четыре члена: JAK1, JAK2, JAK3 и тирозинкиназа 2 (TYK2). Связывание цитокина с JAK–зависимым цитокиновым рецептором индуцирует димеризацию рецептора, что приводит к фосфорилированию тирозиновых остатков на JAK–киназе, вызывая активацию JAK. Фосфорилированные JAK, в свою очередь, связывают и фосфорилируют различные STAT белки, которые димеризуются, интернализуются в ядре клетки и непосредственно модулируют транскрипцию генов, приводя, среди других эффектов, к нисходящим эффектам, связанным с воспалительным заболеванием. JAK обычно ассоциированы в паре с цитокиновыми рецепторами в виде гомодимеров или гетеродимеров. Конкретные цитокины ассоциированы с конкретными JAK–спариваниями. Каждый из четырех членов семейства JAK участвует в передаче сигналов по меньшей мере одного из цитокинов, связанных с воспалением.

Воспаление играет значимую роль во многих глазных заболеваниях, включая увеит, диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, синдром сухого глаза, возрастную дегенерацию желтого пятна, окклюзию вены сетчатки и атопический кератоконъюнктивит. Увеит охватывает множество внутриглазных воспалительных состояний и часто является аутоиммунным, возникающим без известного инфекционного

возбудителя. По оценкам, этим состоянием страдают около 2 миллионов пациентов в США. У некоторых пациентов хроническое воспаление, ассоциированное с увеитом, приводит к разрушению ткани, и он является пятой основной причиной слепоты в США. Цитокины, уровень которых повышен в глазах пациентов с увеитом, которые передают сигналы через JAK–STAT путь, включают IL–2, IL–4, IL–5, IL–6, IL–10, IL–23 и IFN– γ . (Horai and Caspi, *J Interferon Cytokine Res*, **2011**, 31, 733–744; Ooi et al, *Clinical Medicine and Research*, **2006**, 4, 294–309). Существующие терапии увеита часто недостаточно эффективны, и у многих пациентов заболевание плохо контролируется. Стероиды, хотя часто эффективны, связаны с катарактами и повышенным внутриглазным давлением/глаукомой.

Причиной диабетической ретинопатии (DR) является повреждение кровеносных сосудов в сетчатке. Это наиболее распространенная причина потери зрения среди людей с диабетом. Ангиогенные, а также воспалительные пути играют важную роль в заболевании. Часто DR прогрессирует до диабетического макулярного отека (DME), наиболее частой причины потери зрения у пациентов с диабетом. По оценкам, только в США от этого заболевания страдают около 1,5 миллиона пациентов, из которых примерно у 20% заболеванием поражены оба глаза. Считают, что цитокины, которые передают сигналы по пути JAK–STAT, такие как IL–6, а также другие цитокины, такие как IP–10 и MCP–1 (альтернативно называемые CCL2), продукция которых частично управляется передачей сигналов по пути JAK–STAT, играют роль в воспалении, ассоциированном с DR/DME (Abcouwer, *J Clin Cell Immunol*, **2013**, Suppl 1, 1–12; Sohn et al., *American Journal of Ophthalmology*, **2011**, 152, 686–694; Owen and Hartnett, *Curr Diab Rep*, **2013**, 13, 476–480; Cheung et al, *Molecular Vision*, **2012**, 18, 830–837; Dong et al, *Molecular Vision*, **2013**, 19, 1734–1746; Funatsu et al, *Ophthalmology*, **2009**, 116, 73–79). Существующие методы лечения DME недостаточно эффективны: интравитреальное анти–VEGF лечения эффективно только у части пациентов, а стероиды связаны с катарактой и повышенным внутриглазным давлением.

Синдром сухого глаза (DED) представляет собой многофакторное заболевание, которым страдают около 5 миллионов пациентов в США. Считается, что воспаление поверхности глаза играет важную роль в развитии и распространении этого заболевания. Повышенные уровни цитокинов, таких как IL–1, IL–2, IL 4, IL–5, IL–6 и IFN– γ , были отмечены в глазных жидкостях пациентов с DED. (Stevenson et al., *Arch Ophthalmol*, 2012, 130, 90–100), а уровни часто коррелируют с тяжестью заболевания. Считается, что возрастная дегенерация желтого пятна и атопический кератоконъюнктивит связаны с JAK–зависимыми цитокинами.

Окклюзия вен сетчатки (RVO) является широко распространенным глазным инвалидизирующим заболеванием. Обструкция кровотока сетчатки может привести к повреждению сосудистой сети сетчатки, кровоизлиянию и ишемии тканей. Хотя причины RVO являются многофакторными, было показано, что важное значение имеют как сосудистые, так и воспалительные медиаторы (Deobhakta et al., *International Journal of*

Inflammation, 2013, article ID 438412). Повышенные уровни цитокинов, которые передают сигналы через путь JAK–STAT, таких как IL–6 и IL–13, а также других цитокинов, таких как MCP–1, продукция которых частично управляется передачей сигналов JAK–STAT, были обнаружены в тканях глаз пациентов с РВО (Shchuko et al, Indian Journal of Ophthalmology, **2015**, 63(12), 905–911). Хотя многих пациентов с РВО лечат фотокоагуляцией, это по своей сути деструктивная терапия. Анти–VEGF средства также используют, но они эффективны только у части пациентов. Стероидные препараты, которые снижают уровень воспаления в глазу (триамцинолон ацетонид и дексаметазоновые имплантаты), также, как было показано, дают полезные результаты для пациентов с некоторыми формами РВО, но также было показано, что они вызывают катаракты и повышенное внутриглазное давление/глаукому.

Атопический дерматит (AD) является распространенным хроническим воспалительным заболеванием кожи, которым страдают приблизительно 14 миллионов человек только в Соединенных Штатах. По оценкам, в развитых странах AD поражает 10–20% детей и 1–3% взрослых (Bao et al., JAK–STAT, 2013, 2, e24137), и распространенность заболевания увеличивается. Повышение уровня провоспалительных цитокинов, которые зависят от пути JAK–STAT, в частности IL–4, IL–5, IL–10, IL–13 и IFN γ , связывают с AD (Bao et al., Leung et al., The Journal of Clinical Investigation, **2004**, 113, 651–657). Кроме того, было показано, что активация IL–31, другого цитокина, который передает сигналы через спаривание JAK, играет роль в зуде, ассоциированном с хроническим AD состоянием. (Sunkoly et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2006, 117, 411–417).

Астма представляет собой хроническое заболевание дыхательных путей, для которого не существует никакой профилактики или лечения. Заболевание характеризуется воспалением, фиброзом, гиперчувствительностью и ремоделированием дыхательных путей, все это способствует ограничению воздушного потока. По оценкам, в мире от астмы страдают 300 миллионов человек, и, согласно оценкам, к 2025 году число людей, страдающих астмой, вырастет более чем на 100 миллионов. Хотя большинство пациентов могут контролировать симптомы астмы с использованием ингаляционных кортикостероидов, которые можно комбинировать с модификатором лейкотриенов и/или бета–агонистом длительного действия, остается подгруппа пациентов с тяжелой формой астмы, у которых заболевание не контролируется традиционными терапиями. Цитокины, вовлеченные в воспаление при астме, которые передают сигналы через JAK–STAT путь, включают IL–2, IL–3, IL–4, IL–5, IL–6, IL–9, IL–11, IL–13, IL–23, IL–31, IL–27, тимический стромальный лимфопоэтин (TSLP), интерферон– γ (IFN γ) и гранулоцитарный–макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM–CSF). Воспаление дыхательных путей характерно для других респираторных заболеваний, помимо астмы. Хроническая обструктивная болезнь легких (COPD), кистозный фиброз (CF), пневмонит, интерстициальные легочные заболевания (включая идиопатический легочный фиброз), острое повреждение легких, острый респираторный дистресс–синдром, бронхит, эмфизема, облитерирующий бронхиолит и саркоидоз также являются заболеваниями

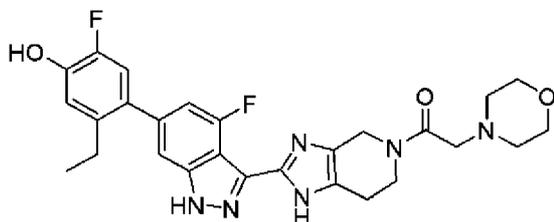
дыхательных путей, патофизиология которых, как считают, связана с JAK–сигнальными цитокинами.

Учитывая количество цитокинов, уровни которых повышены при воспалительных заболеваниях, и то, что каждый цитокин ассоциирован с конкретным JAK–сигналированием, химический ингибитор с широкой активностью против всех членов семейства JAK мог бы иметь широкое применение для лечения глазных, кожных и респираторных заболеваний. Остается потребность в сильном ингибиторе различных JAK.

Сущность изобретения

В одном аспекте изобретение предоставляет соединение, являющееся ингибитором JAK, полезное для лечения воспалительного заболевания.

В частности, в одном аспекте изобретение предоставляет 1–(2–(6–(2–этил–5–фтор–4–гидроксифенил)–4–фтор–1H–индазол–3–ил)–1,4,6,7–тетрагидро–5H–имидазо[4,5–с]пиридин–5–ил)–2–морфолиноэтан–1–он формулы



1

далее указанное как соединение **1**, или его фармацевтически приемлемую соль.

Изобретение также предоставляет кристаллические формы соединения, Форму 1 и Форму 2.

Изобретение также предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую соединение **1** или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель.

В одном аспекте изобретение предоставляет способ лечения глазного заболевания у млекопитающего, включающий введение млекопитающему соединения **1** или фармацевтической композиции по изобретению. В одном аспекте глазное заболевание представляет собой увеит, диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, синдром сухого глаза, возрастную дегенерацию желтого пятна, окклюзию вены сетчатки и атопический кератоконъюнктивит. В частности, глазное заболевание представляет собой диабетический макулярный отек или увеит.

Еще в одном аспекте, относящемся к способу, изобретение предоставляет способ лечения воспалительного заболевания кожи, в частности атопического дерматита, включающему нанесение соединения **1** или фармацевтической композиции по изобретению на кожу млекопитающего.

В другом аспекте изобретение предоставляет способ лечения респираторного заболевания у млекопитающего, включающий введение млекопитающему соединения **1** или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции по

изобретению.

В отдельных и разных аспектах изобретение также предоставляет способы синтеза и промежуточные соединения, описанные в настоящей заявке, которые полезны для получения соединения **1**.

Изобретение также предоставляет соединение **1**, описанное в настоящей заявке, для применения в медицинском лечении, а также применение соединения по изобретению для получения композиции или лекарственного средства для лечения глазного заболевания, кожного заболевания или респираторного заболевания у млекопитающего.

Краткое описание чертежей

Различные аспекты настоящего изобретения проиллюстрированы со ссылкой на прилагаемые чертежи.

Фиг. 1 представляет порошковую рентгеновскую дифрактограмму (PXRD) кристаллической Формы 2 соединения **1** (далее Форма 2).

Фиг. 2 представляет термограмму дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) кристаллической Формы 2.

Фиг. 3 представляет термограмму термического гравиметрического анализа (TGA) кристаллической Формы 2.

Фиг. 4 представляет изотерму динамической сорбции влаги (DMS) кристаллической Формы 2, которую наблюдали при температуре около 25°C

Фиг. 5 представляет полученное при помощи микроскопии в поляризованном свете изображение Формы 2.

Фиг. 6 представляет порошковую рентгеновскую дифрактограмму (PXRD) кристаллической Формы 1 соединения **1** (далее Форма 1).

Фиг. 7 представляет термограмму дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) кристаллической Формы 1.

Фиг. 8 представляет термограмму термического гравиметрического анализа (TGA) кристаллической Формы 1.

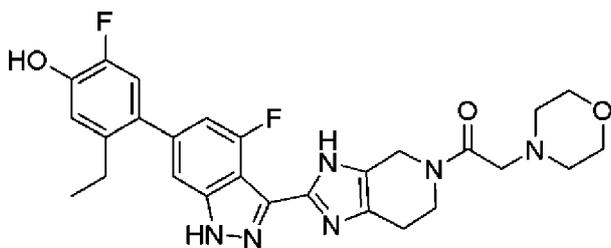
Фиг. 9 представляет изотерму динамической сорбции влаги (DMS) кристаллической Формы 1, которую наблюдали при температуре около 25°C

Фиг. 10 представляет полученное при помощи микроскопии в поляризованном свете изображение Формы 1.

Подробное описание изобретения

Химические структуры названы в настоящей заявке в соответствии с номенклатурой IUPAC, используемой в программе ChemDraw (PerkinElmer, Inc., Cambridge, MA).

Кроме того, имидазольная часть тетрагидроимидазопиридиновой группы в структуре соединения по изобретению существует в таутомерных формах. Соединение может быть также представлено в эквивалентной форме



В соответствии с номенклатурой IUPAC, представленные структуры приводят к разной нумерации атомов тетрагидроимидазопиридиновой части. Соответственно эта структура указана как 1-(2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-4-фтор-1H-индазол-3-ил)-3,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)-2-морфолиноэтан-1-он. Она также может быть указана как 1-(2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-4-фтор-1H-индазол-3-ил)-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)-2-морфолиноэтан-1-он. Должно быть понятно, что, хотя структуры показаны, или названы, в конкретной форме, изобретение также включает их таутомер.

Соединения по изобретению также содержат несколько основных групп, и поэтому такие соединения могут существовать в виде свободного основания или в различных солевых формах, таких как моно-протонированная солевая форма, ди-протонированная солевая форма или их смеси. Все такие формы включены в объем настоящего изобретения, если не указано иное.

Настоящее изобретение также включает изотопно-меченные соединения формулы **1**, то есть соединения формулы **1**, где один или несколько атомов были замещены или обогащены атомом, имеющим тот же атомный номер, но атомную массу, отличную от атомной массы, которая преобладает в природе. Примеры изотопов, которые могут быть включены в соединение формулы **1**, включают, но не ограничиваются этим, ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O и ^{18}F . Особый интерес представляют соединения формулы **1**, обогащенные тритием или углеродом-14, которые можно использовать, например, в исследованиях распределения в тканях. Также особый интерес представляют соединения формулы **1**, обогащенные дейтерием, особенно на участке метаболизма, которые, как ожидается, будут обладать большей метаболической стабильностью. Кроме того, особый интерес представляют соединения формулы **1**, обогащенные позитрон-испускающим изотопом, таким как ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O и ^{13}N , такие соединения можно использовать, например, в исследованиях методом позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ).

Определения

При описании настоящего изобретения, включая его различные аспекты и варианты осуществления, следующие термины имеют следующие значения.

Термин “терапевтически эффективное количество” означает количество, достаточное для осуществления лечения при введении пациенту, нуждающемуся в лечении.

Термин “лечащий” или “лечение” означает профилактику, улучшение или подавление медицинского состояния, заболевания или расстройства, подлежащего

лечению (например, респираторного заболевания) у пациента (в частности, человека); или облегчение симптомов медицинского состояния, заболевания или расстройства.

Термин “фармацевтически приемлемая соль” означает соль, которая является приемлемой для введения пациенту или млекопитающему, такому как человек (например, соли, имеющие приемлемую безопасность для млекопитающего для используемого режима дозирования). Типичные фармацевтически приемлемые соли включают соли уксусной, аскорбиновой, бензолсульфоновой, бензойной, камфорсульфоновой, лимонной, этансульфоновой, 1,2-этандисульфоновой, фумаровой, гентизиновой, глюконовой, глюкуроновой, глутаминовой, гиппуровой, бромистоводородной, хлористоводородной, изетионовой, молочной, лактобионовой, малеиновой, яблочной, миндальной, метансульфоновой, муциновой, нафталинсульфоновой, нафталин-1,5-дисульфоновой, нафталин-2,6-дисульфоновой, никотиновой, азотной, оротовой, памовой, пантотеновой, фосфорной, янтарной, серной, винной, *p*-толуолсульфоновой и ксинафовой кислот и т.п.

Термин “его соль” означает соединение, полученное в результате замены водорода кислоты на катион, такой как катион металла или органический катион и т.п. Например, катион может представлять собой протонированную форму соединения формулы **1**, то есть форму, в которой одна или несколько аминогрупп протонированы кислотой. Как правило, соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль, хотя это не требуется для солей промежуточных соединений, которые не предназначены для введения пациенту.

Термин “амино-защитная группа” означает защитную группу, подходящую для предотвращения нежелательных реакций по азоту аминогруппы. Типичные амино-защитные группы включают, но не ограничиваются этим, формил; ацильные группы, например алканоильные группы, такие как ацетил и трифторацетил; алкоксикарбонильные группы, такие как трет-бутоксикарбонил (Boc); арилметоксикарбонильные группы, такие как бензилоксикарбонил (Cbz) и 9-флуоренилметоксикарбонил (Fmoc); арилметильные группы, такие как бензил (Bn), тритил (Tr) и 1,1-ди-(4'-метоксифенил)метил; силильные группы, такие как триметилсилил (TMS), трет-бутилдиметилсилил (TBDMS), [2-(триметилсилил)этокси]метил (SEM); и т.п.

Термин “гидрокси-защитная группа” означает защитную группу, подходящую для предотвращения нежелательных реакций по гидроксигруппе. Типичные гидроксигруппы включают, но не ограничиваются этим, алкильные группы, такие как метил, этил и трет-бутил; ацильные группы, например, алканоильные группы, такие как ацетил; арилметильные группы, такие как бензил (Bn), *p*-метоксибензил (PMB), 9-флуоренилметил (Fm) и дифенилметил (бензгидрил, DPM); силильные группы, такие как триметилсилил (TMS) и трет-бутилдиметилсилил (TBS); и т.п.

Различные защитные группы, а также их введение и удаление описаны в T.W. Greene and P.G.M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Third Edition, Wiley, New York.

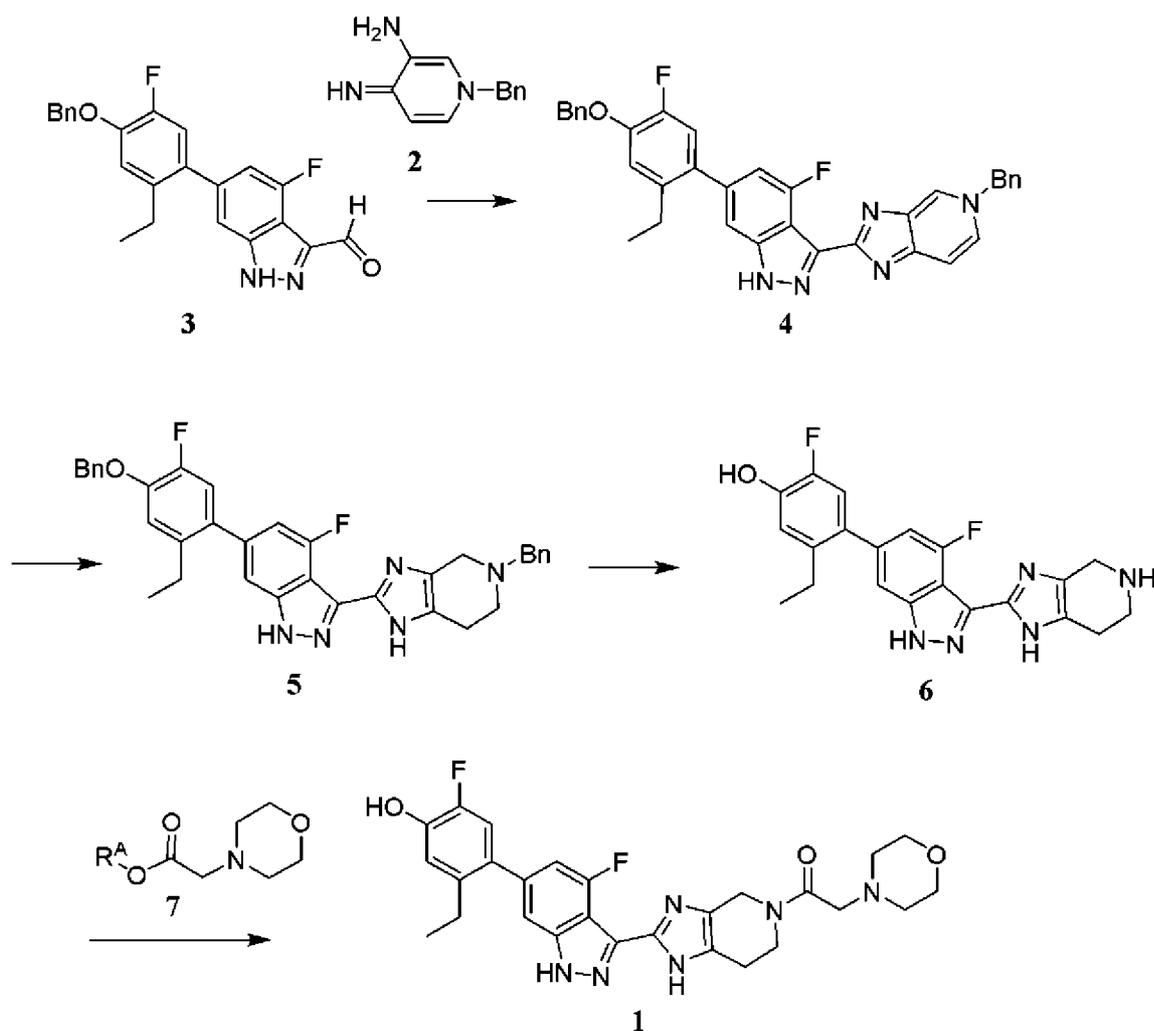
Общие процедуры синтеза

Соединение **1** и его промежуточные соединения можно получить в соответствии со следующими общими способами и процедурами, используя коммерчески доступные или полученные рутинным способом исходные вещества и реагенты. Кроме того, соединения, имеющие кислотный или основной атом или функциональную группу, могут быть использованы или могут быть получены в виде соли, если не указано иное (в некоторых случаях использование соли в конкретной реакции потребует преобразования солевой формы в несолевую, например, в форму свободного основания, используя обычные процедуры перед осуществлением реакции).

Хотя конкретный вариант осуществления настоящего изобретения может быть показан или описан в следующих процедурах, специалисты в данной области поймут, что другие варианты осуществления или аспекты настоящего изобретения также могут быть получены с использованием таких процедур или с использованием других способов, реагентов и исходных веществ, известных специалистам в данной области. В частности, должно быть понятно, что соединение **1** можно получить различными способами, в которых взаимодействующие вещества объединяют в разном порядке, чтобы обеспечить различные промежуточные соединения на пути к получению конечных продуктов.

Получение 1-(2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-4-фтор-1H-индазол-3-ил)-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-c]пиридин-5-ил)-2-морфолиноэтан-1-она (соединение **1**) описано подробно в прилагаемых примерах. Ключевые стадии в общем виде представлены на Схеме 1

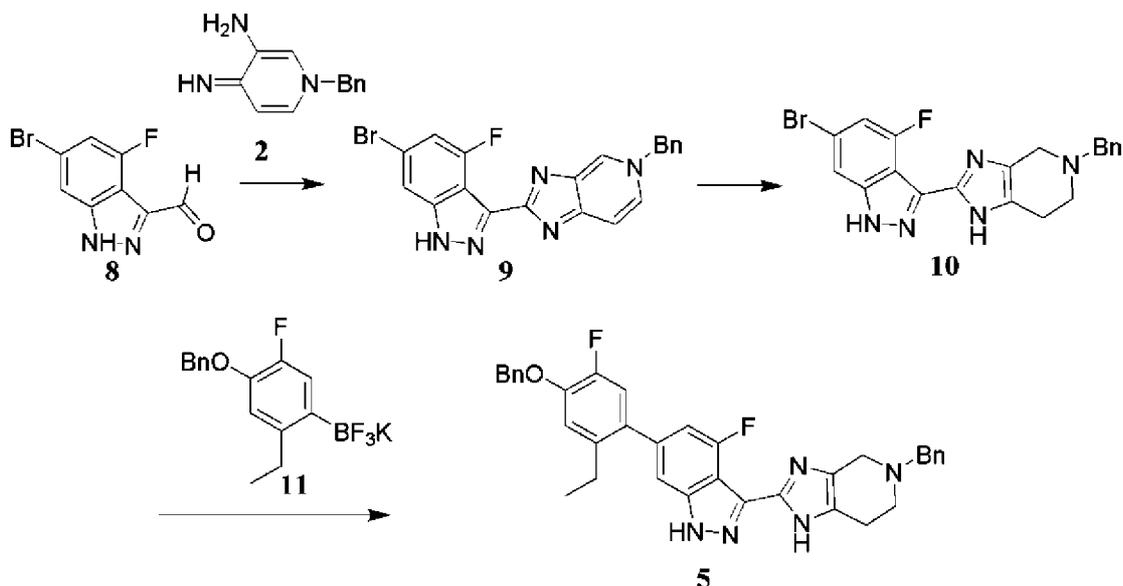
Схема 1



где реагент **7** представляет собой 2,5-диоксопирролидин-1-ил-2-морфолиноацетат, т.е. переменная R^A представляет собой активирующий агент 2,5-диоксопирролидинил, описанный в Примере 1. Альтернативно, морфолин-4-илуксусную кислоту, т.е. R^A представляет собой водород, используют в качестве реагента **7** в типичных условиях образования амидной связи, как описано в Примере 4.

Промежуточное соединение **3** можно получить, как описано в Получениях 1 и 3 ниже. Альтернативный способ получения ключевого защищенного промежуточного соединения **5** проиллюстрирован на Схеме 2.

Схема 2



Броминдазол альдегид **8** можно подвергнуть взаимодействию с бензил-защищенным иминовым соединением **2** с получением промежуточного соединения **9**. Реакцию типично осуществляют в присутствии бисульфита натрия при температуре от около 130°C до около 140°C в течение времени от около 1 до около 6 часов или до тех пор, пока реакция по существу не завершится. Соединение **9** восстанавливают с использованием восстановителя, такого как борогидрид натрия, с получением соединения **10**, которое объединяют с защищенным фенилтрифторборатом **11** в типичных условиях реакции сочетания Сузуки–Мияура с получением промежуточного соединения **5**. Реакцию типично осуществляют при повышенной температуре в присутствии палладиевого катализатора. Используемый в реакции Сузуки партнер **11**, показанный на Схеме 2 как соль трифторбората калия, можно получить путем взаимодействия соответствующего бороната (Промежуточное соединение **1–5** в Получении 1 ниже) с гидродифторидом калия с получением промежуточного соединения **11**. Альтернативно, боронатное промежуточное соединение можно использовать вместо трифторбората **11**.

Соответственно, в аспекте, относящемся к способу, изобретение предоставляет способ получения соединения формулы **1** или его фармацевтически приемлемой соли, включающий взаимодействие соединения формулы **6** с соединением формулы **7**, как проиллюстрировано на Схеме 1, с получением соединения формулы **1** или его фармацевтически приемлемой соли.

В дополнительном аспекте, относящемся к способу, изобретение предоставляет соединение формулы **5** и соединение формулы **6**, полезные для получения соединения формулы **1**.

Кристаллические формы

В другом аспекте изобретение предоставляет 1-(2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-4-фтор-1H-индазол-3-ил)-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-c]пиридин-5-ил)-2-морфолиноэтан-1-он (**1**) в кристаллической форме.

Форма 1

Кристаллическая форма 1 по изобретению представляет собой кристаллическую свободную форму соединения 1. В одном аспекте Форма 1 характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой (PXRD), имеющей характерные дифракционные пики, в числе других пиков, при значениях 2θ $8,16\pm 0,20$, $8,97\pm 0,20$, $15,29\pm 0,20$, $16,70\pm 0,20$, $18,00\pm 0,20$ и $20,18\pm 0,20$. Форма 1 также может характеризоваться порошковой рентгеновской дифрактограммой, имеющей два или более дополнительных дифракционных пиков, в том числе три или более и четыре или более дополнительных дифракционных пиков при значениях 2θ , выбранных из $7,69\pm 0,20$, $10,66\pm 0,20$, $11,46\pm 0,20$, $11,91\pm 0,20$, $15,80\pm 0,20$, $17,02\pm 0,20$, $18,83\pm 0,20$, $22,39\pm 0,20$, $22,98\pm 0,20$, $24,89\pm 0,20$ и $26,54\pm 0,20$. В другом аспекте Форма 1 характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, имеющей три, четыре, пять или шесть дифракционных пиков при значениях 2θ , выбранных из $8,16\pm 0,20$, $8,97\pm 0,20$, $15,29\pm 0,20$, $16,70\pm 0,20$, $18,00\pm 0,20$ и $20,18\pm 0,20$.

Как хорошо известно в области рентгеновской порошковой дифракции, положения пиков на порошковой рентгеновской дифрактограмме относительно менее чувствительны к условиям эксперимента, таким как условия получения образца и инструментальная геометрия, чем относительная высота пиков. Таким образом, в одном аспекте кристаллическая форма 1 характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, на которой положения пиков по существу соответствуют тем, которые показаны на Фиг. 6.

В другом аспекте кристаллическая форма 1 характеризуется поведением при воздействии на нее высокой температуры. Как продемонстрировано на Фиг. 7, термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), полученная при скорости нагрева 10°C в минуту, демонстрирует пик в эндотермическом тепловом потоке, идентифицированный как переход в расплав, в диапазоне от около 210°C до около 234°C , или в диапазоне от около 215°C до около 229°C , или в диапазоне от около 220°C до около 224°C . Кристаллическая форма 1 характеризуется термограммой дифференциальной сканирующей калориметрии, полученной при скорости нагрева 10°C в минуту, которая представляет максимум в эндотермическом тепловом потоке с пиком при около $221,7^\circ\text{C}$. Термограмма термогравиметрического анализа (TGA) на Фиг. 8 не показывает никакой существенной потери массы при температурах ниже температуры начала разложения при около 293°C .

Репрезентативная кривая динамической сорбции влаги (DMS) для Формы 1 кристаллической свободной формы по изобретению показана на Фиг. 9. Кристаллическая форма 1 показала небольшой гистерезис между двумя циклами сорбции и десорбции. Форма 1 показала увеличение массы около $0,99\%$ в диапазоне влажности от 5% до 70% относительной влажности и увеличение массы около $1,32\%$ в диапазоне влажности от 5% до 90% относительной влажности при комнатной температуре, как показано на Фиг. 9. Форма 1 считается слегка гигроскопичной.

Кристаллическая форма 1, как было показано, является стабильной в условиях

воздействия повышенной температуры и влажности. Через 36 недель в ускоренных условиях 40°C и 75% относительной влажности не наблюдали никаких статистически значимых изменений химической чистоты.

Форму 1 можно получить путем растворения соединения **1** в этаноле при нагревании с последующим добавлением ацетонитрила, где отношение ацетонитрила к этанолу составляет около 1:1 или от около 1:3 до 3:1. Полученную смесь затем нагревают с последующим перемешиванием при температуре от около 20°C и около 25°C в течение времени от около 4 часов до около 30 часов или в течение около 16 часов. Твердое вещество затем фильтруют и сушат с получением Формы 1.

Форму 1 также можно получить путем смешивания соединения **1** с этанолом и перемешивания смеси при температуре от около 50 до около 80°C в течение около 2–30 минут или около 10 минут, с последующим медленным добавлением ацетонитрила при температуре от около 50 до около 80°C, где объемное отношение ацетонитрила к этанолу составляет от около 3:1 до 1:1 или около 1,5:1. Можно добавить затравочные кристаллы Формы 1 и перемешивать реакционную смесь при температуре от около 20°C до около 25°C в течение времени от около 4 часов до около 30 часов или в течение около 18 часов. Твердое вещество затем фильтруют и сушат с получением Формы 1.

Форма 2

Кристаллическая форма 2 по изобретению представляет собой кристаллическую свободную форму соединения **1**. В одном аспекте Форма 2 характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой (PXRD), имеющей характерные дифракционные пики, в числе других пиков, при значениях 2θ 10,61±0,20, 11,84±0,20, 14,94±0,20, 18,26±0,20 и 19,06±0,20. Форма 2 также может характеризоваться порошковой рентгеновской дифрактограммой, имеющей дополнительные дифракционные пики при значениях 2θ 13,32±0,20, 17,69±0,20 и 21,10±0,20. Форма 2 также может характеризоваться порошковой рентгеновской дифрактограммой, имеющей два или более дополнительных дифракционных пиков, в том числе три или более и четыре или более дополнительных дифракционных пиков при значениях 2θ , выбранных из 10,85±0,20, 16,14±0,20, 16,35±0,20, 18,43±0,20, 19,20±0,20, 19,49±0,20, 20,72±0,20, 21,94±0,20, 22,64±0,20, 23,64±0,20, 25,19±0,20 и 28,08±0,20.

В другом аспекте Форма 2 характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, имеющей три, четыре, пять или шесть дифракционных пиков при значениях 2θ , выбранных из 10,61±0,20, 11,84±0,20, 13,32±0,20, 14,94±0,20, 17,69±0,20, 18,26±0,20, 19,06±0,20 и 21,10±0,20.

Как хорошо известно в области рентгеновской порошковой дифракции, положения пиков на порошковой рентгеновской дифрактограмме относительно менее чувствительны к условиям эксперимента, таким как условия получения образца и инструментальная геометрия, чем относительная высота пиков. Таким образом, в одном аспекте кристаллическая форма 2 характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, на которой положения пиков по существу соответствуют тем, которые показаны на Фиг.

1.

Структура кристаллической Формы 2 также охарактеризована методом рентгеновской дифракции монокристаллов. Кристаллы относятся к орторомбической кристаллической системе и $R\bar{3}c$ пространственной группе. Размеры элементарной ячейки следующие: $a=9,7245(11)$ Å, $b=16,8197(14)$ Å, $c=32,604(4)$ Å, $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=90^\circ$, объем= $5332,8(10)$ Å³. Рассчитанная плотность $1,302$ г/см³. Кристаллы содержат восемь молекул на элементарную ячейку. Структура подтверждает, что кристаллы не содержат молекулы воды или другого растворителя и молекулярная структура соответствует структуре соединения Примера 1, показанной в настоящей заявке. Рентгенодифракционные пики, предсказанные из выведенных атомных положений вполне соответствуют наблюдаемым результатам.

В другом аспекте кристаллическая форма 2 характеризуется поведением при воздействии на нее высокой температуры. Как продемонстрировано на Фиг. 2, термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), полученная при скорости нагрева 10°C в минуту, демонстрирует пик в эндотермическом тепловом потоке, идентифицированный как переход в расплав, в диапазоне от около 268°C до около 277°C , или в диапазоне от около 270°C до около 275°C , или в диапазоне от около 271°C до около 274°C . Кристаллическая форма 2 характеризуется термограммой дифференциальной сканирующей калориметрии, полученной при скорости нагрева 10°C в минуту, которая представляет максимум в эндотермическом тепловом потоке с пиком при около $272,6\pm 2^\circ\text{C}$.

Термограмма термогравиметрического анализа (TGA) на Фиг. 3 не показывает никакой существенной потери массы при температурах ниже температуры начала разложения при около 269°C .

Репрезентативная изотерма динамической сорбции влаги (DMS) для Формы 2 кристаллической свободной формы по изобретению показана на Фиг. 4. Кристаллическая форма 2 не показала никакого гистерезиса между двумя циклами сорбции и десорбции и показала исключительно низкую тенденцию к гигроскопичности. Форма 2 показала увеличение массы около $0,18\%$ в диапазоне влажности от 5% до 90% относительной влажности и увеличение массы около $0,12\%$ в диапазоне влажности от 5% до 70% относительной влажности при комнатной температуре, как показано на Фиг. 4. Форма 2 считается негигроскопичной.

Форму 2 можно получить путем растворения соединения 1 примера 1 в DMSO (например, при соотношении 1 г соединения 1 на 1–3 мл или около 2 мл DMSO) при температуре около $45\text{--}75^\circ\text{C}$ или при около 60°C , с последующим добавлением метанола, где объемное отношение метанола к DMSO составляет от около 1:4 до около 1:1 или около 1:2. Гомогенную смесь затем добавляют по каплям к предварительно смешанному раствору метанола и воды (где отношение метанола к DMSO находится в пределах от 1,5 до 3 к 1), при температуре между около 60 и около 90°C , или около 75°C , где в предварительно смешанном растворе объемное отношение метанола к воде составляет от

около 0,5:1 до около 1:2 или около 1:0,9. Смесь затем оставляют для перемешивания при температуре между около 60 и около 90°C, или около 75°C, в течение от около 30 минут до около 2 часов или около 1 часа. Затем можно медленно добавить воду при температуре между около 60 и около 90°C, или около 75°C, где объемное отношение воды к метанолу находится в пределах от 2 и 4. Полученную суспензию затем медленно охлаждают до комнатной температуры (типично до температуры от около 20 до около 25°C), типично от около 2 до около 12 часов или около 6 часов. Суспензию затем выдерживают при комнатной температуре и затем фильтруют и промывают смесью воды и метанола при содержании воды от около 50 до около 90%, или около 70%, с получением **Формы 2**.

В одном аспекте изобретение предоставляет способ получения кристаллической формы 2, включающий:

(а) образование гомогенной смеси 1-(2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-4-фтор-1H-индазол-3-ил)-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)-2-морфолиноэтан-1-она в полярном апротонном растворителе, или в полярном смешивающемся с водой растворителе, или в смеси полярного апротонного растворителя и полярного смешивающегося с водой растворителя при температуре между 45 и 75°C;

(b) добавление гомогенной смеси к смеси смешивающегося с водой растворителя и воды при температуре между 60 и 90°C с получением второй смеси;

(с) медленное добавление воды к второй смеси при температуре между 60 и 90°C с получением суспензии; и

(d) выделение кристаллической формы из суспензии.

В некоторых аспектах полярный апротонный растворитель стадии (а) выбран из группы, состоящей из DMSO, DMF, NMP, DMAc и нитрометана, полярный смешивающийся с водой растворитель стадии (а) выбран из группы, состоящей из ацетонитрила, ацетона, метанола, этанола и THF, и смешивающийся с водой растворитель стадии (b) выбран из группы, состоящей из ацетонитрила, ацетона, метанола, этанола, n-пропанола, изопропанола, n-бутанола, THF, DMSO, DMF, NMP, DMAc и нитрометана. В некоторых аспектах полярный апротонный растворитель стадии (а) представляет собой DMSO, полярный смешивающийся с водой растворитель стадии (а) представляет собой метанол, а смешивающийся с водой растворитель стадии (b) представляет собой метанол.

В некоторых аспектах суспензию, полученную на стадии (с), охлаждают до температуры между около 20 и 25°C перед стадией (d).

Альтернативно, **Форму 2** можно получить путем перемешивания соединения **1**, полученного в примере 1, в смеси полярного смешивающегося с водой растворителя и воды, при температуре между 60 и 90°C. В некоторых аспектах отношение растворителя к воде составляет около 1:1 или от 2:1 до 0,5:1. В некоторых аспектах полярный смешивающийся с водой растворитель выбран из группы, состоящей из ацетонитрила, ацетона, метанола, этанола, n-пропанола, изопропанола, n-бутанола, THF, DMSO, DMF, NMP, DMAc и нитрометана.

Фармацевтические композиции

Соединение **1** и его фармацевтически приемлемые соли типично используют в форме фармацевтической композиции или препарата. Такие фармацевтические композиции могут быть полезны для введения пациенту любым приемлемым путем введения, включая, но не ограничиваясь этим, пероральный, ингаляционный, глазные инъекции, местный (включая чрескожный), ректальный, назальный и парентеральный пути введения.

Соответственно, в одном из его аспектов, относящихся к композициям, изобретение направлено на фармацевтическую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент и соединение **1**, где, как определено выше, "соединение **1**" означает соединение **1** или его фармацевтически приемлемую соль. Необязательно, такие фармацевтические композиции могут содержать другие терапевтические средства и/или вещества, используемые для формулирования препаратов, в случае необходимости. При обсуждении композиций и их применений соединение **1** также может быть указано как "активное вещество".

В некоторых аспектах изобретение предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую соединение **1** или его фармацевтически приемлемую соль, или Форму 1 или Форму 2 и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция является подходящей для глазного применения. В некоторых аспектах композиция является подходящей для инъекции в глаз. В некоторых аспектах композиция является подходящей для интравитреальной инъекции. В некоторых аспектах композиция представляет собой суспензию. В некоторых аспектах композиция представляет собой кристаллическую суспензию. В некоторых аспектах композиция представляет собой суспензию Формы 1 или Формы 2.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению обычно содержат терапевтически эффективное количество соединения **1**. Специалистам в данной области должно быть понятно, однако, что фармацевтическая композиция может содержать больше, чем терапевтически эффективное количество, то есть нерасфасованные композиции, или меньше, чем терапевтически эффективное количество, то есть отдельные единичные дозы, предназначенные для многократного введения для достижения терапевтически эффективного количества.

Как правило, такие фармацевтические композиции будут содержать от около 0,01 до около 95% по массе активного вещества; включая, например, от около 0,05 до около 30% по массе; и от около 0,1% до около 10% по массе активного вещества.

В фармацевтических композициях по настоящему изобретению можно использовать любой обычный носитель или эксципиент. Выбор конкретного носителя или эксципиента, или комбинаций носителей или эксципиентов, будет зависеть от способа введения, используемого для лечения конкретного пациента, или от типа медицинского состояния или болезненного состояния. В этом отношении, получение подходящей фармацевтической композиции для конкретного способа введения находится в пределах компетенции специалистов в области фармацевтики. Кроме того, носители или

эксципиенты, используемые в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, являются коммерчески доступными. В качестве дополнительной иллюстрации, традиционные методы формулирования описаны в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000); и H.C. Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999).

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

Фармацевтические композиции обычно получают путем тщательного и тесного смешивания или вымешивания активного вещества с фармацевтически приемлемым носителем и одним или несколькими необязательными ингредиентами. Полученную однородно смешанную смесь затем можно формовать или загружать в таблетки, капсулы, пилюли и т.п., используя обычные процедуры и оборудование.

Фармацевтические композиции по изобретению предпочтительно упакованы в виде стандартной лекарственной формы. Термин "стандартная лекарственная форма" относится к физически дискретной единице, подходящей для введения пациенту, т.е. каждая единица содержит предварительно определенное количество активного вещества, рассчитанное для обеспечения желаемого терапевтического эффекта либо отдельно, либо в комбинации с одной или несколькими дополнительными единицами. Например, такими стандартными лекарственными формами могут быть капсулы, таблетки, пилюли и т.п., или индивидуальные упаковки, подходящие для глазного или парентерального введения.

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции по изобретению являются подходящими для перорального введения. Подходящие фармацевтические композиции для перорального введения могут быть в форме капсул, таблеток, пилюль, пастилок, саше, драже, порошков, гранул; или в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости; или в виде жидкой эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле; или в виде эликсира или сиропа; и т.п.; при этом каждая из этих форм содержит заранее

определенное количество соединения **1** в качестве активного ингредиента.

Если они предназначены для перорального введения в твердой лекарственной форме (т.е. в форме капсул, таблеток, пилюль и т.п.), фармацевтические композиции по настоящему изобретению, как правило, будут включать активное вещество и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей. Необязательно, такие твердые лекарственные формы также могут включать: наполнители или добавки для увеличения объема, такие как крахмалы, микрокристаллическая целлюлоза, лактоза, дикальцийфосфат, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; связующие, такие как карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или аравийская камедь; увлажнители, такие как глицерин; разрыхлители, такие как натрий кроскармеллоза, агар–агар, карбонат кальция, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, некоторые силикаты и/или карбонат натрия; замедляющие растворение агенты, такие как парафин; ускорители абсорбции, такие как четвертичные аммониевые соединения; смачивающие агенты, такие как цетиловый спирт и/или глицерин моностеарат; абсорбенты, такие как каолиновая и/или бентонитовая глина; смазывающие вещества, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и/или их смеси; красители; и буферные агенты.

Разделительные агенты, смачивающие агенты, покрывающие агенты, подсластители, отдушки и ароматизаторы, консерванты и антиоксиданты также могут присутствовать в фармацевтических композициях по изобретению. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, цистеин гидрохлорид, бисульфат натрия, метабисульфат натрия, сульфит натрия и т.п.; маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, лецитин, пропилгаллат, альфа–токоферол и т.п.; и металл–хелатирующие агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота, сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п. Покрывающие агенты для таблеток, капсул, пилюль и т.п. включают агенты, используемые для энтеросолюбильных покрытий, такие как ацетатфталат целлюлозы, поливинилацетатфталат, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлоза, метакриловая кислота, сополимеры сложных эфиров метакриловой кислоты, ацетат–триметиллат целлюлозы, карбоксиметилэтилцеллюлоза, ацетат–сукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы и т.п.

Фармацевтические композиции по изобретению также можно сформулировать для обеспечения медленного или контролируемого высвобождения активного вещества с использованием, например, гидроксипропилметилцеллюлозы в различных пропорциях; или других полимерных матриц, липосом и/или микросфер. Кроме того, фармацевтические композиции по изобретению могут необязательно содержать средства, придающие непрозрачность, и могут быть сформулированы таким образом, чтобы они

высвобождали активный ингредиент только или предпочтительно в определенной части желудочно–кишечного тракта, необязательно замедленным образом. Примеры композиций для заливки, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски. Активное вещество также может быть в микрокапсулированной форме, если необходимо, с одним или несколькими из вышеописанных эксципиентов.

Подходящие жидкие лекарственные формы для перорального введения включают, в качестве иллюстрации, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Жидкие лекарственные формы обычно включают активное вещество и инертный разбавитель, такой как, например, вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3–бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, зародышевое, оливковое, касторовое и кунжутное масло), олеиновая кислота, глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры сорбитана и жирных кислот и их смеси. Альтернативно, некоторые жидкие композиции могут быть преобразованы, например, путем распылительной сушки, в порошок, который используют для получения твердых лекарственных форм обычными способами.

Суспензии, в дополнение к активному ингредиенту, могут содержать суспендирующие агенты, такие как, например, этоксилированные изостеариловые спирты, сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитола и сорбитана, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар–агар и трагакант и их смеси.

Соединение **1** также можно вводить парентерально (например, путем внутривенной, подкожной, внутримышечной или интраперитонеальной инъекции). Для парентерального введения активное вещество обычно смешивают с подходящим носителем для парентерального введения, включающим, в качестве примера, стерильные водные растворы, физиологический раствор, низкомолекулярные спирты, такие как пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, желатин, сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат, и т.п. Парентеральные композиции могут также содержать один или несколько антиоксидантов, солюбилизаторов, стабилизаторов, консервантов, смачивающих агентов, эмульгаторов, буферных агентов или диспергирующих агентов. Эти композиции можно сделать стерильными путем использования стерильной инъекционной среды, стерилизующего агента, фильтрации, облучения или нагрева.

Соединение **1** также можно сформулировать в виде стерильной водной суспензии или раствора для глазной инъекции. Полезные эксципиенты, которые могут быть включены в такую водную композицию, включают полисорбат 80, полимеры целлюлозы, такие как карбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, хлорид калия, хлорид кальция, хлорид натрия, хлорид магния, ацетат натрия, цитрат натрия, гистидин, дигидрат α -трегалозы, сахарозу, полисорбат 20, гидроксипропил- β -

циклодекстрин, бензалконийхлорид, амберлит IRP-69, эфиры полиоксиэтиленгликоля (лауриловый, стеариловый и олеиловый), натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, таурохолат натрия, сапонины и кремофор EL, поликарбофил-цистеин, ксантановую камедь, геллановую камедь, гиалуроновую кислоту, липосомы и фосфат натрия. В композицию могут быть включены усилители проницаемости, поверхностно-активные вещества, желчные кислоты, циклодекстрины, такие как 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин, и хелатирующие агенты. Цилиндрические олигонуклеотиды с гидрофильной внешней поверхностью и липофильной внутренней поверхностью, которые способны образовывать комплексы с активным веществом, также могут быть включены в композицию. Бензиловый спирт может служить в качестве консерванта, а хлорид натрия может быть включен для регулирования тоничности. Кроме того, к раствору можно добавить хлористоводородную кислоту и/или гидроксид натрия для регулирования pH. Могут быть получены водные композиции для внутриглазных инъекций, не содержащие консервантов.

Офтальмологическая композиция может обеспечить возможность замедленного высвобождения активного ингредиента в глаз. Офтальмологическая композиция может быть сформулирована в виде эмульсии (масло-в-воде или вода-в-масле), суспензии или мази. Композиция суспензии может содержать соединение **1** или его фармацевтически приемлемую соль в виде кристаллической формы, например, Формы 1 или Формы 2, или в аморфном состоянии.

Соединение **1** также можно сформулировать так, чтобы оно было подходящим для введения в виде глазных капель или интравитреального имплантата. Имплантат может обеспечивать доставку постоянных терапевтических уровней лекарственного средства. Резервуарные имплантаты обычно получают с использованием гранулированного лекарственного ядра, окруженного нереакционноспособными веществами, такими как кремний, этиленвинилацетат (EVA) или поливиниловый спирт (PVA); эти имплантаты не являются биоразлагаемыми и могут доставлять количество лекарственного средства непрерывно в течение времени от нескольких месяцев до года. Матричные имплантаты также можно использовать. Обычно их используют для доставки нагрузочной дозы с последующим снижением дозы препарата в течение периода времени от 1 дня до 6 месяцев. Чаще всего их изготавливают из сополимеров полимолочной кислоты (PLA) и/или поли-молочной-гликолевой кислоты (PLGA), которые разлагаются до воды и диоксида углерода. Также можно использовать ионофорез. Это неинвазивный метод, в котором небольшой электрический ток применяется для усиления проникновения ионизированного лекарственного средства в ткани.

Технологию инкапсуляции клеток (ECT), которая представляет собой систему доставки на основе клеток, также можно использовать для доставки терапевтического средства в глаз. Обычно генетически модифицированные клетки упаковывают в полую трубку с полупроницаемой мембраной, которая предотвращает проникновение иммунных клеток и позволяет питательным веществам и терапевтическим молекулам свободно

диффундировать через мембрану. Два конца полимерной секции герметично закрыты, и титановая петля расположена на анкерном конце, который имплантируется в плоскую часть ресничного тела и прикрепляется к склере.

Соединение **1** можно сформулировать в любую форму, обеспечивающую возможность доставки к задней части глаза. Примеры способов доставки известны из литературы (Kuno et al., *Polymers*, 2011, 3, 193–221, del Amo et al., *Drug Discovery Today*, 2008, 13, 135–143, Short, *Toxicologic Pathology*, 2008, 36 49–62). Такие способы доставки включают, но не ограничиваются этим, супрахориоидальную доставку, которая обеспечивает доставку в сосудистую оболочку и сетчатку через супрахориоидальное пространство, доставку в суб–теноново пространство, периокулярную доставку, контактные линзы, obturаторы слезных точек и склеральные пробки. Соединение **1** также может быть доставлено путем периокулярной, супрасклеральной, ретробульбарной, перibuльбарной или субконъюнктивальной инъекции.

Соединение **1** может быть доставлено в виде эмульсии, полимерных микро– или наносфер, липосом, микро– или наночастиц, микросфер, мицелл или дендримеров. Можно использовать биоразлагаемые и биосовместимые полимеры, такие как полиактид и PLGA. Соединение **1** может быть инкапсулировано.

Кроме того, соединение **1** можно сформулировать для местного нанесения на кожу в виде мази или крема. Композиции мази представляют собой полутвердые препараты, имеющие основу из маслянистого или жирного вещества, которое обычно является прозрачным. Подходящие маслянистые вещества для использования в композициях мазей включают вазелин (вазелиновое масло), пчелиный воск, масло какао, масло ши и цетиловый спирт. Мази необязательно могут дополнительно включать смягчающие средства и усилители проникновения, если это желательно.

Композиции кремов могут быть получены в виде эмульсий, содержащих масляную фазу и водную фазу, обычно включающую очищенную воду. Компоненты композиций кремов могут включать: масляные основы, такие как вазелин, минеральные масла, растительные и животные масла и триглицериды; основы для крема, такие как ланолиновые спирты, стеариновая кислота и цетостеариловый спирт; гелевую основу, такую как поливиниловый спирт; растворители, такие как пропиленгликоль и полиэтиленгликоль; эмульгаторы, такие как полисорбаты, стеараты, такие как глицерилстеарат, октилгидроксистеарат, полиоксилстеарат, ПЭГ стеариловые эфиры, изопрропилпальмитат и сорбитанмоностеарат; стабилизаторы, такие как полисахариды и сульфит натрия; смягчающие средства (то есть увлажнители), такие как среднецепочечные триглицериды, изопрропилмириститат и диметикон; укрепляющие агенты, такие как цетиловый спирт и стеариловый спирт; противомикробные средства, такие как метилпарабен, пропилпарабен, феноксиэтанол, сорбиновая кислота, диазолидинилмочевина и бутилированный гидроксианизол; усилители проникновения, такие как N–метилпирролидон, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль монолаурат и т.п.; и хелатообразующие агенты, такие как динатрий эдетат.

Альтернативно, фармацевтические композиции по изобретению формулируют для введения путем ингаляции. Подходящие фармацевтические композиции для введения путем ингаляции обычно находятся в форме аэрозоля или порошка. Такие композиции обычно вводят с использованием хорошо известных устройств доставки, таких как дозирующий ингалятор, ингалятор сухого порошка, небулайзер или подобное устройство доставки.

При введении путем ингаляции с использованием контейнера под давлением фармацевтические композиции по изобретению обычно включают активный ингредиент и подходящий пропеллент, такой как дихлордифторметан, трихлорфторметан, дихлортетрафторэтан, диоксид углерода или другой подходящий газ. Кроме того, фармацевтическая композиция может быть в форме капсулы или картриджа (изготовленного, например, из желатина), содержащего соединение **1** и порошок, подходящий для использования в порошковом ингаляторе. Подходящие порошковые основы включают, в качестве примера, лактозу или крахмал.

Следующие неограничивающие примеры иллюстрируют репрезентативные фармацевтические композиции по настоящему изобретению.

Пероральная твердая лекарственная форма в виде таблеток

Осуществляют сухое смешивание соединения **1** или его фармацевтически приемлемой соли с микрокристаллической целлюлозой, поливинилпирролидоном и натрий кроскармеллозой в соотношении 4:5:1:1 и прессуют в таблетки с получением стандартной дозы, например, 5 мг, 20 мг или 40 мг активного вещества на таблетку.

Пероральная твердая лекарственная форма в виде капсул

Соединение **1** или его фармацевтически приемлемую соль объединяют с микрокристаллической целлюлозой, поливинилпирролидоном и натрий кроскармеллозой в соотношении 4:5:1:1 методом мокрого гранулирования и загружают в желатиновые или гидроксипропилметилцеллюлозные капсулы с получением стандартной дозы, например, 5 мг, 20 мг или 40 мг активного вещества на капсулу.

Жидкая композиция

Жидкую композицию, содержащую соединение **1** (0,1%), воду (98,9%) и аскорбиновую кислоту (1,0%), получают путем добавления соединения по изобретению к смеси воды и аскорбиновой кислоты.

Пероральная лекарственная форма с энтеросолюбильным покрытием

Соединение **1** растворяют в водном растворе, содержащем поливинилпирролидон, и наносят распылением на гранулы из микрокристаллической целлюлозы или сахара в соотношении 1:5 масс/масс активное вещество:гранулы и затем наносят увеличивающее массу примерно на 5% энтеросолюбильное покрытие, включающее акриловый сополимер. Гранулы с энтеросолюбильным покрытием загружают в желатиновые или гидроксипропилметилцеллюлозные капсулы с получением стандартной дозы, например, 30 мг активного вещества на капсулу.

Пероральная лекарственная форма с энтеросолюбильным покрытием

Энтеросолюбильное покрытие, включающее комбинацию Eudragit-L® и Eudragit-S® или ацетат-сукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы, наносят на пероральную дозированную форму в виде таблетки или пероральную дозированную форму в виде капсулы, описанную выше.

Водная композиция для глазной инъекции

Каждый мл стерильной водной суспензии включает от 5 мг до 50 мг соединения **1**, хлорид натрия для тоничности, 0,99% (масс/об) бензилового спирта в качестве консерванта, 0,75% натрий карбоксиметилцеллюлозы и 0,04% полисорбата. Можно включить гидроксид натрия или хлористоводородную кислоту для доведения pH до 5–7,5.

Водная композиция для глазной инъекции

Стерильная не содержащая консервантов водная суспензия включает от 5 мг/мл до 50 мг/мл соединения **1** в 10 mM фосфата натрия, 40 mM хлорида натрия, 0,03% полисорбата 20 и 5% сахарозы.

Композиция мази для местного введения

Соединение **1** объединяют с вазелином, C₈–C₁₀ триглицеридом, октилгидроксистеаратом и N-метилпирролидоном в таком соотношении, чтобы получить композицию, содержащую 0,05%–5% масс. активного вещества.

Композиция мази для местного введения

Соединение **1** объединяют с медицинским вазелином, пропиленгликолем, моно- и ди-глицеридами, парафином, бутилированным гидрокситолуолом и кальция динатрия эдетатом в таком соотношении, чтобы получить композицию, содержащую 0,05% до 5% масс. активного вещества.

Композиция мази для местного введения

Соединение **1** объединяют с минеральным маслом, парафином, пропиленкарбонатом, медицинским вазелином и белым воском с получением композиции, содержащей 0,05%–5% масс. активного вещества.

Композиция крема для местного введения

Минеральное масло объединяют с соединением **1**, пропиленгликолем, изопропилпальмитатом, полисорбатом 60, цетиловым спиртом, сорбитанмоностеаратом, полиоксил 40 стеаратом, сорбиновой кислотой, метилпарабеном и пропилпарабеном с получением масляной фазы, которую объединяют с очищенной водой путем смешивания с высоким усилием сдвига с получением композиции, содержащей 0,05% до 5% масс. активного вещества.

Композиция крема для местного введения

Композиция крема, содержащая соединение **1**, бензиловый спирт, цетиловый спирт, безводную лимонную кислоту, моно и ди-глицериды, олеиловый спирт, пропиленгликоль, цетостеарилсульфат натрия, гидроксид натрия, стеариловый спирт, триглицериды и воду, содержит 0,05% до 5% масс. активного вещества.

Композиция крема для местного введения

Композиция крема, содержащая соединение **1**, цетостеариловый спирт,

изопропилмиристат, пропиленгликоль, цетомакрогол 1000, диметикон 360, лимонную кислоту, цитрат натрия и очищенную воду, с имидмочевинной, метилпарабен и пропилпарабен в качестве консервантов, содержит 0,05% до 5% масс. активного вещества.

Композиция сухого порошка

Тонкоизмельченное соединение **1** (1 г) смешивают с измельченной лактозой (25 г). Полученную смесь затем загружают в индивидуальные блистеры легко отслаиваемой блистерной упаковки в количестве, достаточном для получения от около 0,1 мг до около 4 мг соединения **1** на дозу. Содержимое блистеров вводят с использованием ингалятора сухого порошка.

Композиция для дозирующего ингалятора

Тонкоизмельченное соединение **1** (10 г) диспергируют в растворе, полученном путем растворения лецитина (0,2 г) в деминерализованной воде (200 мл). Полученную суспензию сушат распылением и затем тонко измельчают с получением тонкоизмельченной композиции, содержащей частицы, имеющие средний диаметр меньше чем около 1,5 мкм. Тонкоизмельченную композицию затем загружают в картриджи дозирующего ингалятора, содержащие находящийся под давлением 1,1,1,2-тетрафторэтан, в количестве, достаточном для получения от около 0,1 мг до около 4 мг соединения **1** на дозу при введении посредством дозирующего ингалятора.

Композиция для небулайзера

Соединение **1** (25 мг) растворяют в растворе, содержащем 1,5–2,5 эквивалента хлористоводородной кислоты, с последующим добавлением гидроксида натрия для доведения pH до 3,5–5,5 и 3% масс. глицерина. Раствор тщательно перемешивают до полного растворения всех компонентов. Раствор вводят с использованием небулайзера, который обеспечивает около 0,1 мг до около 4 мг соединения **1** на дозу.

Полезность

Соединение **1**, как было показано, является сильным ингибитором ферментов семейства JAK: JAK1, JAK2, JAK3 и TYK2.

Глазные заболевания

Было показано, что многие глазные заболевания связаны с повышением уровня провоспалительных цитокинов, которые зависят от пути JAK–STAT. Поскольку соединение **1** демонстрирует сильное ингибирование всех четырех ферментов JAK, ожидается, что оно должно сильно ингибировать передачу сигналов и патогенные эффекты многочисленных цитокинов (таких как IL–6, IL–2 и IFN– γ), которые передают сигналы через JAK, а также препятствовать повышению уровней других цитокинов (таких как MCP–1 и IP–10), продукция которых зависит от сигнального пути JAK–STAT.

В частности, соединение **1** показало IC_{50} значения 6,4 или больше (IC_{50} значения

400 нМ или меньше) для ингибирования передачи сигналов IL-6, IL-2 и IFN γ в клеточных анализах, описанных в Анализах 3–6, включая анализы, регистрирующие ингибирование нисходящих эффектов повышения уровня цитокинов.

Фармакокинетическое исследование в Анализе 7 продемонстрировало длительную экспозицию в глазных тканях кролика после одной интравитреальной инъекции и концентрацию в плазме по меньшей мере на три порядка ниже, чем концентрация, наблюдаемая в стекловидной ткани.

Кроме того, интравитреальное введение соединения **1** продемонстрировало значительное ингибирование IL-6-индуцированного pSTAT3 в ткани сетчатки/сосудистой оболочки глаз крысы, а также значительное и устойчивое ингибирование IFN- γ -индуцированного IP-10 в стекловидном теле кролика, а также в тканях сетчатки/сосудистой оболочки глаз. Внутривитреальное введение соединения **1** продемонстрировало существенное и устойчивое ингибирование IFN- γ -индуцированного pSTAT1 у кролика.

Как ожидают, устойчивое ингибирование JAK в тканях глаз в отсутствие существенных системных уровней приведет к сильной локальной противовоспалительной активности в глазу без системно-вызываемых побочных эффектов. Таким образом, ожидают, что соединение **1** будет полезным для различных глазных заболеваний, которые включают, но не ограничиваются этим, увеит, диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, синдром сухого глаза, возрастную дегенерацию желтого пятна, окклюзию вены сетчатки и атопический кератоконъюнктивит.

В частности, увеит (Horai and Caspi, *J Interferon Cytokine Res*, **2011**, 31, 733–744), диабетическая ретинопатия (Abcouwer, *J Clin Cell Immunol*, **2013**, Suppl 1, 1–12), диабетический макулярный отек (Sohn et al., *American Journal of Ophthalmology*, **2011**, 152, 686–694), синдром сухого глаза (Stevenson et al, *Arch Ophthalmol*, **2012**, 130, 90–100), окклюзия вены сетчатки (Shchuko et al, *Indian Journal of Ophthalmology*, **2015**, 63(12), 905–911) и возрастная дегенерация желтого пятна (Knickelbein et al, *Int Ophthalmol Clin*, **2015**, 55(3), 63–78) характеризуются повышением уровней некоторых провоспалительных цитокинов, которые передают сигналы через JAK-STAT путь. Соответственно, соединение **1** может облегчать ассоциированное воспаление глаз и вызывать регрессию прогрессирующего заболевания или обеспечивать облегчение симптомов этих заболеваний.

Поэтому в одном аспекте изобретение предоставляет способ лечения глазного заболевания у млекопитающего, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей 1-(2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-4-фтор-1H-индазол-3-ил)-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)-2-морфолиноэтан-1-он или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтический носитель, в глаз млекопитающего. В одном аспекте глазное заболевание представляет собой увеит, диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, синдром сухого глаза, возрастную дегенерацию желтого пятна, окклюзию вены сетчатки или атопический

кератоконъюнктивит. В одном аспекте способ включает введение соединения **1** путем интравитреальной инъекции.

Воспалительное кожное заболевание

Например, атопический дерматит связан с повышением уровня провоспалительных цитокинов, которые зависят от пути JAK–STAT, в частности IL–4, IL–5, IL–10, IL–13 и IFN γ . В дополнение к ингибированию цитокинов в клеточных анализах, указанных выше, соединение **1** показало IC₅₀ значение 13 нМ для ингибирования IL–13, как описано в Анализе 2. Кроме того, модельные композиции соединения **1** в форме крема и мази продемонстрировали устойчивые уровни в коже в течение по меньшей мере 2 дней у мышей и по меньшей мере 7 дней у мини–свинок без обнаруживаемой экспозиции в плазме.

Ожидается, что устойчивые уровни в коже соединения **1** в отсутствие значительных системных уровней приведут к сильной местной противовоспалительной и противозудной активности в коже без побочных эффектов, вызванных системным воздействием. Следовательно, ожидается, что соединение **1** будет полезным при различных воспалительных или зудящих кожных состояниях, которые включают, но не ограничиваются этим, очаговую алопецию, витилиго, кожную T–клеточную лимфому, узелковую чесотку, красный плоский лишай, первичный локальный кожный амилоидоз, буллезный пемфигоид, кожные проявления болезни трансплантат–против–хозяина, пемфигоид, дискоидную волчанку, кольцевидную гранулему, простой хронический лишай, влажный/мошоночный/перианальный зуд, склерозирующий лишай, зуд после герпетической невралгии, плоский фолликулярный лишай и декальвирующий фолликулит. В частности, очаговая алопеция (Xing et al., *Nat Med.* **2014**, 20, 1043–9), витилиго (Craiglow et al., *JAMA Dermatol.* **2015**, 151, 1110–2), узелковая чесотка (Sonkoly et al., *J Allergy Clin Immunol.* **2006**, 117, 411–7), красный плоский лишай (Welz–Kubiak et al., *J Immunol Res.* **2015**; 2015:854747), первичный локализованный амилоидоз кожи (Tanaka et al., *Br J Dermatol.* **2009**, Dec; 161(6):1217–24), буллезный пемфигоид (Feliciani et al., *Int J Immunopathol Pharmacol.* **1999**, May–Aug; 12(2); 55–61) и кожные проявления реакции трансплантат–против–хозяина (Okiyama et al., *J Invest Dermatol.* **2014**, Apr; 134(4):992–1000) характеризуются повышением уровня некоторых цитокинов, которые передают сигналы через активацию JAK. Соответственно, соединение **1** может облегчать ассоциированные с этими цитокинами кожные воспаления или зуд. В частности, можно ожидать, что соединение **1** будет полезно для лечения атопического дерматита и других воспалительных заболеваний кожи.

Поэтому в одном аспекте изобретение предоставляет способ лечения воспалительного кожного заболевания у млекопитающего (например, человека), включающий нанесение фармацевтической композиции, содержащей 1–(2–(6–(2–этил–5–фтор–4–гидроксифенил)–4–фтор–1H–индазол–3–ил)–1,4,6,7–тетрагидро–5H–имидазо[4,5–с]пиримидин–5–ил)–2–морфолиноэтан–1–он или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтический носитель, на кожу млекопитающего. В одном аспекте воспалительное

кожное заболевание представляет собой атопический дерматит.

Соединение **1** также можно использовать в комбинации с грам-положительными антибиотиками, такими как мупироцин и фузидовая кислота, для лечения воспалительных кожных заболеваний. Поэтому в одном аспекте изобретение предоставляет способ лечения воспалительного кожного заболевания у млекопитающего, включающий нанесение соединения **1** и грам-положительного антибиотика на кожу млекопитающего. В другом аспекте изобретение предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую 1-(2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-4-фтор-1H-индазол-3-ил)-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)-2-морфолиноэтан-1-он или его фармацевтически приемлемую соль, грам-положительный антибиотик и фармацевтически приемлемый носитель.

Респираторные заболевания

Цитокины, которые передают сигналы через JAK-STAT путь, в частности IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-13, IL-23, IL-31, IL-27, тимический стромальный лимфопоэтин (TSLP), интерферон- γ (IFN γ) и гранулоцитарный-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), также вовлечены в воспаление при астме и в другие воспалительные респираторные заболевания. Как описано выше, было показано, что соединение **1** является сильным ингибитором JAK1, JAK2, JAK3 и TYK2 ферментов и также показало сильное ингибирование провоспалительных цитокинов в клеточных анализах.

Противовоспалительная активность ингибиторов JAK наглядно продемонстрирована в доклинических моделях астмы (Malaviya et al., *Int Immunopharmacol*, **2010**, 10, 829,-836; Matsunaga et al., *Biochem and Biophys Res Commun*, **2011**, 404, 261-267; Kudlacz et al., *Eur J Pharmacol*, **2008**, 582, 154-161.) Соответственно, ожидают, что соединение **1** будет полезным для лечения воспалительных респираторных расстройств, в частности, астмы. Воспаление и фиброз легкого характерны для других респираторных заболеваний, помимо астмы, таких как хроническая обструктивная болезнь легких (COPD), кистозный фиброз (CF), пневмонит, интерстициальные легочные заболевания (включая идиопатический легочный фиброз), острое повреждение легких, острый респираторный дистресс-синдром, бронхит, эмфизема и облитерирующий бронхиолит. Поэтому также ожидают, что соединение **1** будет полезно для лечения хронической обструктивной болезни легких, кистозного фиброза, пневмонита, интерстициальных легочных заболеваний (включая идиопатический легочный фиброз), острого повреждения легких, острого респираторного дистресс-синдрома, бронхита, эмфиземы, облитерирующего бронхиолита и саркоидоза.

Поэтому в одном аспекте изобретение предоставляет способ лечения респираторного заболевания у млекопитающего (например, у человека), включающий введение млекопитающему 1-(2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-4-фтор-1H-индазол-3-ил)-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)-2-морфолиноэтан-1-она или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном аспекте респираторное заболевание представляет собой астму, хроническую обструктивную болезнь легких, кистозный фиброз, пневмонит, хроническую обструктивную болезнь легких (COPD), кистозный фиброз (CF), пневмонит, интерстициальные легочные заболевания (включая идиопатический легочный фиброз), острое повреждение легких, острый респираторный дистресс-синдром, бронхит, эмфизему, облитерирующий бронхиолит или саркоидоз. В другом аспекте респираторное заболевание представляет собой астму или хроническую обструктивную болезнь легких.

В другом аспекте респираторное заболевание представляет собой легочную инфекцию, гельминтоз, легочную артериальную гипертензию, саркоидоз, лимфангиолейомиоматоз, бронхоэктаз, инфильтративное заболевание легких. Еще в одном аспекте респираторное заболевание представляет собой лекарственный пневмонит, грибковый пневмонит, аллергический бронхолегочный аспергиллез, гиперчувствительный пневмонит, эозинофильный гранулематоз с полиангиитом, идиопатическую острую эозинофильную пневмонию, идиопатическую хроническую эозинофильную пневмонию, гиперэозинофильный синдром, синдром Леффлера, облитерирующий бронхиолит с организуемой пневмонией или индуцированный ингибиторами иммунных контрольных точек пневмонит.

Изобретение также обеспечивает способ лечения астмы у млекопитающего, включающий введение млекопитающему фармацевтической композиции, содержащей 1-(2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-4-фтор-1H-индазол-3-ил)-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)-2-морфолиноэтан-1-он или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель.

Соединение **1** или его фармацевтически приемлемая соль также могут быть полезны для лечения эозинофильных легочных заболеваний. Эозинофильное воспаление дыхательных путей является характерной особенностью заболеваний, которые в совокупности называются эозинофильными заболеваниями легких (Cottin et al., Clin. Chest. Med., 2016, 37(3), 535–56). Эозинофильные заболевания ассоциированы с передачей сигналов IL-4, IL-13 и IL 5. Эозинофильные заболевания легких включают инфекции (особенно, гельминтозы), лекарственный пневмонит (индуцированный, например, терапевтическими препаратами, такими как антибиотики, фенитоин или триптофан или 1-триптофан), грибковый пневмонит (например, аллергический бронхолегочный аспергиллез), гиперчувствительный пневмонит и эозинофильный гранулематоз с полиангиитом (ранее известный как синдром Чарга-Штрауса). Эозинофильные заболевания легких неизвестной этиологии включают идиопатическую острую эозинофильную пневмонию, идиопатическую хроническую эозинофильную пневмонию, гиперэозинофильный синдром и синдром Леффлера.

Соединение **1** или его фармацевтически приемлемая соль также могут быть полезны для лечения РАН. Полиморфизм в гене IL-6 связывают с повышенными уровнями IL-6 и повышенным риском развития легочной артериальной гипертензии (РАН) (Fang et al., J Am Soc Hypertens., 2017, 11(3), 171–177). Подтверждая роль IL-6 в

РАН, ингибирование ингибирование цепи gp130 рецептора IL-6 облегчает заболевание в крысиной модели РАН (Huang et al., *Can J Cardiol.*, **2016**, 32(11), 1356.e1–1356.e10).

Соединение **1** или его фармацевтически приемлемая соль также могут быть полезны для лечения неаллергических заболеваний легких, таких как саркоидоз и лимфангиолейомиоматоз. Цитокины, такие как IFN γ , IL-12 и IL-6, вовлечены в ряд неаллергических заболеваний легких, таких как саркоидоз и лимфангиолейомиоматоз (El-Hashemite et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **2005**, 33, 227–230, и El-Hashemite et al., *Cancer Res.*, **2004**, 64, 3436–3443).

Соединение **1** или его фармацевтически приемлемая соль также могут быть полезны для лечения бронхоэктаза и инфильтративных легочных заболеваний, которые представляют собой заболевания, ассоциированные с хроническим нейтрофильным воспалением. Некоторые цитокины ассоциированы с нейтрофильным воспалением (например, IL-6, IFN γ).

Патологическая активация Т-клеток имеет решающее значение в этиологии множественных респираторных заболеваний. Аутореактивные Т-клетки играют роль в облитерирующем бронхиолите с организующейся пневмонией (также называемом COS). Подобно COS, этиология отторжения трансплантата легкого связана с aberrантной Т-клеточной активацией Т-клеток реципиентов трансплантированным легким донора. Отторжения трансплантата легких могут произойти раньше в виде первичной дисфункции трансплантата (PGD), организующейся пневмонии (OP), острого отторжения (AR) или лимфоцитарного бронхиолита (LB), или они могут произойти спустя годы после трансплантации легкого в виде хронической дисфункции аллотрансплантата легкого (CLAD). CLAD ранее был известен как облитерирующий бронхиолит (BO), но теперь считается синдромом, который может иметь различные патологические проявления, включая BO, рестриктивный CLAD (rCLAD или RAS) и нейтрофильную дисфункцию аллотрансплантата. Хроническая дисфункция аллотрансплантата легкого (CLAD) является серьезной проблемой в долгосрочной тактике лечения реципиентов с легочным трансплантатом, поскольку заставляет трансплантированное легкое постепенно терять функциональность (Gauthier et al., *Curr Transplant Rep.*, 2016, 3(3), 185–191). CLAD плохо реагирует на лечение, и, следовательно, остается потребность в эффективных соединениях, способных к предотвращению или лечению этого состояния. Некоторые JAK-зависимые цитокины, такие как IFN γ и IL-5, активируются при CLAD и отторжении трансплантата легкого (Berastegui et al, *Clin Transplant.* **2017**, 31, e12898). Кроме того, высокий уровень хемокинов CXCR3 в легких, таких как CXCL9 и CXCL10, которые находятся на нисходящем JAK-зависимом IFN сигнальном пути, связаны с худшими исходами у пациентов с трансплантированным легким (Shino et al, *PLOS One*, 2017, 12 (7), e0180281). Было показано, что системное ингибирование JAK эффективно при отторжении трансплантата почки (Vicenti et al., *American Journal of Transplantation*, 2012, 12, 2446–56). Поэтому соединение **1** может быть эффективным при лечении или профилактике отторжения трансплантата легких и CLAD. Подобные события активации

T–клеток, описанные в качестве основы для отторжения трансплантата легкого, также считают основным фактором, вызывающим заболевание легких, ассоциированное с реакцией трансплантат–против–хозяина (GVHD), которая может происходить после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Как и в случае с CLAD, GVHD легкого является хроническим прогрессирующим заболеванием с крайне плохими исходами, и в настоящее время нет одобренного лечения. Ретроспективное многоцентровое обзорное исследование 95 пациентов с стероид–резистентной острой или хронической GVHD, которые получали системный ингибитор JAK руксолитиниб в качестве консервативной терапии, продемонстрировало полный или частичный ответ на руксолитиниб у большинства пациентов, включая пациентов с GVHD легких (Zeiser et al, *Leukemia*, 2015, 29, 10, 2062–68). Совсем недавно при более активном использовании ингибиторов иммунных контрольных точек появился индуцированный ингибиторами иммунных контрольных точек пневмонит, еще одно опосредованное T–клетками заболевание легких. У больных раком, получавших эти стимуляторы T–клеток, может развиваться фатальный пневмонит. Соединение **1** или его фармацевтически приемлемая соль являются потенциально возможным новым лечением этих недооцененных серьезных респираторных заболеваний.

Желудочно–кишечные заболевания

В качестве ингибиторов JAK, соединение **1** или его фармацевтически приемлемая соль также могут быть полезны при множестве других заболеваний. Соединение **1** или его фармацевтически приемлемая соль могут быть полезны при различных желудочно–кишечных воспалительных симптомах, которые включают, но не ограничиваются этим, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит (проктосигмоидит, панколит, язвенный проктит и левосторонний колит), болезнь Крона, коллагенозный колит, лимфоцитарный колит, болезнь Бехчета, целиакию, индуцированный ингибитором иммунных контрольных точек колит, илеит, эозинофильный эзофагит, связанный с реакцией трансплантат–против–хозяина колит и инфекционный колит. Язвенный колит (Reimund et al., *J Clin Immunology*, **1996**, 16, 144–150), болезнь Крона (Woywodt et al., *Eur J Gastroenterology Hepatology*, **1999**, 11, 267–276), коллагенозный колит (Kumawat et al., *Mol Immunology*, **2013**, 55, 355–364), лимфоцитарный колит (Kumawat et al., **2013**), эозинофильный эзофагит (Weinbrand–Goichberg et al., *Immunol Res*, **2013**, 56, 249–260), связанный с реакцией трансплантат–против–хозяина колит (Coghill et al., *Blood*, **2001**, 117, 3268–3276), инфекционный колит (Stallmach et al., *Int J Colorectal Dis*, **2004**, 19, 308–315), болезнь Бехчета (Zhou et al., *Autoimmun Rev*, **2012**, 11, 699–704), целиакия (de Nitto et al., *World J Gastroenterol*, **2009**, 15, 4609–4614), индуцированный ингибитором иммунных контрольных точек колит (например, индуцированный ингибитором CTLA–4 колит; (Yano et al., *J Translation Med*, **2014**, 12, 191), индуцированный ингибитором PD–1 или PD–L1 колит) и илеит (Yamamoto et al., *Dig Liver Dis*, **2008**, 40, 253–259) характеризуются повышением уровня некоторых провоспалительных цитокинов. Поскольку многие провоспалительные цитокины передают сигналы посредством активации JAK, соединение

1 или его фармацевтически приемлемая соль могут облегчать воспаление и обеспечивать облегчение симптомов. В частности, соединение **1** или его фармацевтически приемлемая соль могут быть полезны для индукции и поддержания ремиссии язвенного колита, а также для лечения болезни Крона, индуцированного ингибитором иммунных контрольных точек колита и побочных желудочно-кишечных эффектов реакции трансплантат-против-хозяина. Следовательно, в одном аспекте изобретение предоставляет способ лечения желудочно-кишечного воспалительного заболевания у млекопитающего (например, у человека), включающий введение млекопитающему соединения **1** или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и соединение **1** или его фармацевтически приемлемую соль.

Другие заболевания

Соединение **1** или его фармацевтически приемлемая соль также могут быть полезны для лечения других заболеваний, таких как другие воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания или раковые заболевания.

Соединение **1** или его фармацевтически приемлемая соль могут быть полезны для лечения одного или нескольких заболеваний, выбранных из артрита, ревматоидного артрита, ювенильного ревматоидного артрита, отторжения трансплантата, ксерофтальмии, псориазического артрита, диабета, инсулинозависимого диабета, заболевания двигательных нейронов, миелодиспластического синдрома, боли, саркопении, кахексии, септического шока, системной красной волчанки, лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоцитарного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, острого миелогенного лейкоза, анкилозирующего спондилита, миелофиброза, В-клеточной лимфомы, гепатоцеллюлярной карциномы, болезни Ходжкина, рака молочной железы, множественной миеломы, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легкого, светлоклеточного рака яичников, опухоли яичника, опухоли поджелудочной железы, истинной полицитемии, синдрома Шегрена, саркомы мягких тканей, саркомы, спленомегалии, Т-клеточной лимфомы и большой талассемии.

Комбинированная терапия

Соединения по настоящему изобретению или их фармацевтически приемлемый соли можно использовать в комбинации с одним или несколькими средствами, которые действуют по одному и тому же механизму или по различным механизмам для лечения заболевания. Разные средства можно вводить последовательно или одновременно, в отдельных композициях или в одной и той же композиции. Подходящие классы средств для комбинированной терапии включают, но не ограничиваются этим, антиангиогенные средства, стероиды, противовоспалительные средства, ингибитор плазменного калликреина, ингибитор лиганда плацентарного фактора роста, ингибитор лиганда VEGF-A, ингибитор лиганда-2 ангиопоэтина, ингибитор протеинтирозинфосфатазы бета, стимулятор тирозинкиназного Тек рецептора, ингибитор кальциневрина, ингибитор лиганда VEGF, ингибитор mTOR комплекса 1, ингибитор mTOR, антагонист IL-17,

модулятор кальмодулина, антагонист рецептора FGF, антагонист рецептора PDGF, антагонист VEGF рецептора, ингибитор лиганда TNF альфа, TNF-связывающий агент, стимулятор протеогликана 4, ингибитор лиганда VEGF-C, ингибитор лиганда VEGF-D, антагонист CD126, ингибитор каскада комплемента, агонист глюкокортикоида, ингибитор фактора комплемента C5, антагонист каннабиноидного рецептора, модулятор рецептора-1 сфингозин-1-фосфата, модулятор рецептора-3 сфингозин-1-фосфата, модулятор рецептора-4 сфингозин-1-фосфата, модулятор рецептора-5 сфингозин-1-фосфата, ингибитор ацетальдегиддегидрогеназы, ингибитор тирозинкиназы Flt3, ингибитор тирозинкиназы Kit, ингибитор протеинкиназы C, лиганд адренкортикотропного гормона, ингибитор лиганда стромально-клеточного фактора 1, агонист иммуноглобулина G1; ингибитор лиганда Интерлейкина-1 бета, стимулятор муцина; модулятор ядерного фактора каппа В, стимулятор белка-4 цитотоксических Т-лимфоцитов, ингибитор гликопротеина CD28 поверхности Т-клеток, стимулятор липопротеинлипазы; агонист PPAR альфа, агонист аденозинового A3 рецептора, антагонист ангиотензинового II рецептора, антагонист рецептора VEGF, лиганд интерферона-бета, модулятор SMAD-2; ингибитор лиганда TGF бета 1, агонист рецептора соматостатина, ингибитор альфа субъединицы IL-2 рецептора, ингибитор лиганда VEGF-B, лиганд тимозина бета 4, антагонист рецептора AT-1 ангиотензина II, антагонист хемокина CCR2, ингибитор мембранной медь-содержащей аминоксидазы, антагонист CD11a, ингибитор ICAM-1, антагонист инсулиноподобного фактора роста 1, ингибитор калликреина, стимулятор фукозилтрансферазы 6, модулятор фукоза-синтетазы GDP, ингибитор гена GHR, ингибитор гена IGF1, антагонист рецептора VEGF-1, агонист альбумина, антагонист IL-2, антагонист CSF-1; антагонист рецептора PDGF, антагонист рецептора VEGF-2, ингибитор mTOR, агонист PPAR альфа, ингибитор Rho ГТФазы, ингибитор Rho-ассоциированной протеинкиназы, ингибитор C3 комплемента, ингибитор транскрипционного фактора EGR-1, модулятор ядерного связанного с эритроидом-2 фактора, ингибитор ядерного фактора каппа В, антагонист интегрин альфа-V/бета-3, агонист рецептора эритропоэтина, агонист глюкагон-подобного пептида 1, стимулятор гена TNFRSF1A, ингибитор лиганда-2 ангиопоэтина, ингибитор антиплазмина альфа-2, антагонист коллагена, ингибитор фибронектина, антагонист ламинина, стимулятор плазмина, лиганд фактора роста нервов, антагонист рецептора FGF1, антагонист рецептора FGF3, ингибитор тирозинкиназы Itk, ингибитор тирозинкиназы Lck, ингибитор тирозинкиназного рецептора Ltk, антагонист PDGF рецептора-альфа, антагонист PDGF рецептора-бета, ингибитор протеинтирозинкиназы, антагонист VEGF-3 рецептора, ингибитор мембранной медь-содержащей аминоксидазы, агонист соматостатин 2-рецептора, агонист соматостатин 4-рецептора, агонист соматостатин-5 рецептора, ингибитор протеинкиназы C альфа, ингибитор протеинкиназы C бета, протеинкиназы C дельта, ингибитор протеинкиназы C эпсилон, ингибитор протеинкиназы C эта, ингибитор протеинкиназы C тета, модулятор анкирина, стимулятор муцина, агонист пуринергического рецептора P2Y2, ингибитор белка межклеточных щелевых контактов

альфа-1, антагонист хемокина CCR3; ингибитор лиганда эотаксина, ингибитор амилорид-чувствительных натриевых каналов, антагонист рецептора PDGF, ингибитор протеинтирозинкиназы, ингибитор белка пигментного эпителия сетчатки, ингибитор матриксной металлопротеиназы, антагонист рецептора PDGF, антагонист PDGF рецептора-бета, ингибитор лиганда PDGF-B, антагонист рецептора гормона роста, ингибитор молекулы клеточной адгезии, модулятор интегрина, антагонист хемокина CXCR4, ингибитор белка, содержащего суперспиральный домен, модулятор Hsp 90, ингибитор Rho-ассоциированной протеинкиназы, ингибитор гена VEGF, ингибитор эндоглина, антагонист хемокина CCR3, модулятор калиевых каналов maxIK, стимулятор калиевых каналов maxIK, агонист PGF2 альфа, агонист простаноидного рецептора, модулятор потенциал-зависимых хлоридных каналов 2, антагонист рецептора C5a комплемента, ингибитор инозинмонофосфатдегидрогеназы, ингибитор лиганда интерлейкина 18, стимулятор M8 катионного канала TRP, агонист рецептора CNTF, ингибитор гена TRPV1, стимулятор дезоксирибонуклеазы I, ингибитор гена IRS1, ингибитор Rho-ассоциированной протеинкиназы, ингибитор поли(АДФ-рибоза)полимеразы 1, ингибитор поли(АДФ-рибоза)полимеразы 2, ингибитор поли(АДФ-рибоза)полимеразы 3, агонист ванилоидного VR1, стимулятор гена NFAT5, стимулятор муцина, ингибитор тирозинкиназы Syk, агонист альфа 2-адренорецепторов, ингибитор циклооксигеназы, ингибитор отложения амилоидного белка, ингибитор киназы-3 гликогенсинтазы, стимулятор PARP, ингибитор отложения тау, ингибитор гена DDIT4, модулятор синтеза гемоглобина, ингибитор лиганда интерлейкина-1 бета, антагонист TNF, стимулятор потенциал-зависимых калиевых каналов KCNQ, антагонист рецептора NMDA, ингибитор циклооксигеназы 1, ингибитор циклооксигеназы, агонист 5-HT 1a рецептора, ингибитор кальциевых каналов, модулятор лиганда FGF-2, ингибитор фосфоинозитид 3-киназы, антагонист CD44, модулятор гиалуронидазы, агонист гиалуроновой кислоты, антагонист IL-1, антагонист IL-1 рецептора I типа, ингибитор фактора P комплемента, антагонист тубулина, антагонист бета-амилоидов, стимулятор гена IL2, ингибитор I-каппа B киназы бета, модулятор ядерного фактора каппа B, ингибитор ингибитора 1 активатора плазминогена, лиганд FGF-2, модулятор протеазы и модулятор кортикотропина.

Конкретные средства, которые можно использовать в комбинации с соединениями-ингибиторами JAK по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются этим, ланаделумаб, афлиберсепт, RG-7716, АКВ-9778, циклоспорин, бевацизумаб, эверолимус, секукинумаб, флуоцинолон ацетонид, RP-101, скваламин лактат, рекомбинантный человеческий лубрицин, OPT-302, сарилумаб, дексаметазон, экулизумаб, финголимод, адалимумаб, репроксалап, мидостаурин, кортикотропин, олаптесед пегол, канакинумаб, рекофлавон, абатацепт, фенофибрат, пиклиденосон, OpRegen, кандесартан, голимумаб, пегаптаниб, интерферон-бета, диситертид, октреотид ацетат, анекортав, базиликсимаб, супрахороидальный триамцинолон ацетонид, RGN-259, дифлупреднат, HL-036, авацинкаптад пегол натрий, ирбесартан, пропагерманий,

триамцинолон ацетонид, азитромицин, BI-1467335, лифитеграст, лотепреднол этабонат, тепротумумаб, KVD-001, TZ-101, атезидорсен, Nov-03, бевацизумаб, AVA-101, RU-101, воклоспорин, вороланиб, сиролimus, холин фенофибрат, VX-210, APL-2, CPC-551, эламипретид, SF-0166, цибинетид, эламипретид, лираглутид, EYS-606, несвакумаб, афлиберцепт, окриплазмин, филготиниб, ценегермин, адипосел, бролицизумаб, ранибизумаб, афлиберцепт, паделипорфин фотодинамическую терапию, пазопаниб, ASP-8232, велдореотид, сотрастаурин, абиципар пегол, диквафозол тетранатрий, HCB-1019, конберцепт, бертилимумаб, SHP-659, THR-317, ALK-001, PAN-90806, интерферон альфа-2b, флуоцинолон, сунитиниб малат, эмиксустат, hI-con1, TB-403, миноциклин, MA09-hRPE клетки, пепплераниб натрий, пегвизомант, луминат, буриксафор, H-1129, каротуксимаб, AXP-1275, ранибизумаб, изопропилунопростон, тезидолумаб, микофенолят натрия с энтеросолюбильным покрытием, тадекиниг альфа, триамцинолон ацетонид, циклоспорин, ST-266, AVX-012, NT-501-ECT, тиванизиран, вертепорфин, дорназу альфа, аганирсен, рипасудил, рукапариб фосфат, зукапсаин, тетратиомолибдат, диклофенак, LHA-510, AGN-195263, такролимус, ребамипид, R-348, бримонитин тартрат, визомитин, T-89, LME-636, BI-1026706, римексолон, тобрамицин, TOP-1630, талапорфин, бромфенак натрий, триамцинолон ацетонид, давунетид, лотепреднол этабонат, XED-60, EG-Миротин, APD-209, аденовир, PF-04523655, гидроксикарбамид, навамепент, ретиналамин, CNTO-2476, ранибизумаб, флупиртин, B27PD, S-646240, GLY-230, гидралазин, непафенак, DexNP, Трегалозу, гиалуроновую кислоту, депо-препарат дексаметазона-Ca с замедленным высвобождением, налузотан, гиалуронидазу, гиалуронат натрия, изунакинра, соматостатин, CLG-561, OC-10X, UCA-002, рекомбинантный человеческий эпидермальный фактор роста, пемироласт, VM-100, MB-11316, мононатрий альфа люминол, ранибизумаб, IMD-1041, LMG-324, HE-10, цингиалуронат натрия, BDM-E, мезенхимальные клетки-предшественники, дисульфирам, CTC-96, PG-101, Weifushu, химотрипсин.

Изобретение также предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую соединение **1** или его фармацевтически приемлемую соль и одно или более других терапевтических средств. Терапевтическое средство может быть выбрано из класса средств, определенного выше, и из перечня конкретных средств, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является подходящей для доставки в глаз. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой жидкую или суспензионную композицию.

Кроме того, в аспекте, относящемся к способу, настоящее изобретение предоставляет способ лечения заболевания или расстройства у млекопитающего, включающий введение млекопитающему соединения **1** или его фармацевтически приемлемой соли и одного или нескольких других терапевтических средств.

При использовании в комбинированной терапии средства могут быть сформулированы в одну фармацевтическую композицию, или средства могут быть представлены в отдельных композициях, которые вводят одновременно или в разное

время одним и тем же или разными путями введения. Такие композиции могут быть упакованы отдельно или могут быть упакованы вместе в виде набора. Два или более терапевтических средств в наборе можно вводить одним и тем же путем введения или различными путями введения.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры синтеза и биологические примеры предложены для иллюстрации изобретения, и никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения. В приведенных ниже примерах следующие аббревиатуры имеют следующие значения, если не указано иное. Аббревиатуры, не определенные ниже, имеют общепринятые значения.

ACN =	ацетонитрил
DCC =	дициклогексилкарбодиимид
DIPEA =	N, N-диизопропилэтиламин
DMAc =	диметилацетамид
DMF =	N, N-диметилформамид
DMSO =	диметисульфоксид
EtOAc =	этилацетат
HATU =	N, N, N',N'-тетраметил-О-(7-азабензотриазол-1-ил)уроний гексафторфосфат
LDA =	диизопропиламид лития
мин =	минута(минуты)
MTBE =	Метил- <i>трет</i> -бутиловый эфир
NBS =	N-бромсукцинимид
NMP =	N-Метил-2-пирролидон
RT =	комнатная температура
THF =	тетрагидрофуран
бис(пинаколато)дибор =	4,4,5,5,4',4',5',5'-октаметил- [2,2']би[[1,3,2]диоксабороланил]
Pd(dppf)Cl ₂ -CH ₂ Cl ₂ =	комплекс дихлор(1,1'-бис(дифенилфосфино)-ферроцен)-дипалладия(II) с дихлорметаном

Реагенты и растворители приобретали у коммерческих поставщиков (Aldrich, Fluka, Sigma и т.д.) и использовали без дополнительной очистки. Реакции отслеживали при помощи тонкослойной хроматографии (ТСХ), аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (анал. ВЭЖХ) и масс-спектрометрии. Реакционные смеси обрабатывали, как описано конкретно для каждой реакции; обычно их очищали

экстракцией и другими методами очистки, такими как температура- и растворитель-зависимая кристаллизация, а также преципитация. Кроме того, реакционные смеси обычно очищали колоночной хроматографией или препаративной ВЭЖХ, обычно с использованием колонок с насадкой C18 или BDS и традиционных элюентов. Типичные условия препаративной ВЭЖХ описаны ниже.

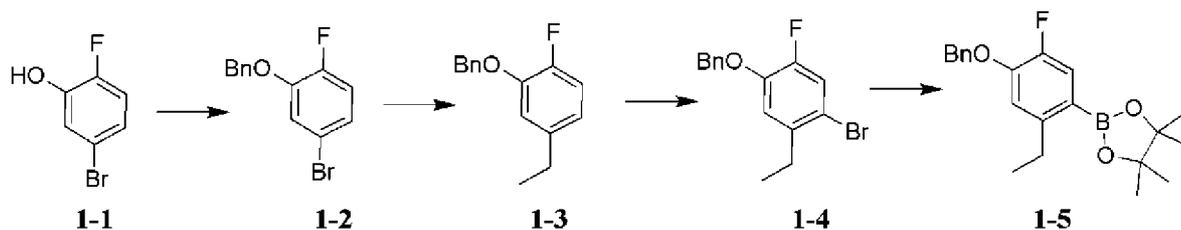
Продукты реакции обычно охарактеризовывали методом масс- и ^1H -ЯМР спектроскопии. Для ЯМР анализа образцы растворяли в дейтерированном растворителе (таком, как CD_3OD , CDCl_3 или d_6 -DMSO) и спектры ^1H -ЯМР получали с использованием устройства Varian Gemini 2000 (400 МГц) в стандартных условиях наблюдения. Масс-спектрометрическую идентификацию соединений осуществляли методом электрораспылительной ионизации (ESMS) с использованием устройства Applied Biosystems (Foster City, CA) модель API 150 EX или устройства Waters (Milford, MA) 3100, соединенных с системами автоочистки.

Условия препаративной ВЭЖХ

Колонка:	C18 5 мкм 21,2×150 мм, или C18 5 мкм 21×250, или C14 5 мкм 21×150 мм
Температура колонки:	Комнатная температура
Скорость потока:	20,0 мл/мин
Подвижные фазы:	A=Вода+0,05% TFA B=ACN+0,05% TFA
Объем вводимой пробы:	(100–1500 мкл)
Длина волны детектора:	214 нм

Неочищенные соединения растворяли в смеси 1:1 вода:уксусная кислота при около 50 мг/мл. 4-минутный цикл в аналитическом масштабе осуществляли, используя колонку C18 2,1×50 мм, с последующим 15- или 20-минутным циклом в препаративном масштабе, используя объем вводимой пробы 100 мкл, с градиентом, основанном на удерживании % В эксперимента в аналитическом масштабе. Точные градиенты зависели от образца. Образцы с близко элюируемыми примесями проверяли на колонке C18 21×250 мм и/или колонке C14 21×150 мм для лучшего разделения. Фракции, содержащие желаемый продукт, идентифицировали при помощи масс-спектрометрического анализа.

Получение 1: 2-(4-(бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан (1-5)



(а) 2-(Бензилокси)-4-бром-1-фторбензол (1-2)

Две реакции осуществляли параллельно и объединяли для последующей обработки. Смесь 5-бром-2-фторфенола (**1-1**) (850 г, 4,5 моль), бензилбромида (837 г, 4,9 моль) и карбоната калия (923 г, 6,7 моль) в ACN (5 л) перемешивали при 20°C в течение 12 часов. Реакции объединяли и концентрировали, разбавляли водой (8 л) и экстрагировали при помощи EtOAc (3 × 3 л). Органический слой отделяли, промывали насыщенным соевым раствором (3 л), сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Неочищенный продукт очищали через слой силикагеля (элюировали смесью 3:1 петролейный эфир:EtOAc) с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (1,83 кг, 73% выход) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,38–7,46 (м, 5H), 7,15 (дд, J=7,6, 2,0 Гц, 1H), 6,98–7,15 (м, 1H), 5,12 (с, 2H).

(b) 2-(Бензилокси)-4-этил-1-фторбензол (**1-3**)

Шесть реакций осуществляли параллельно и объединяли для последующей обработки. К раствору продукта предыдущей стадии (200 г, 711 ммоль) в THF (100 мл) добавляли карбонат калия (197 г, 1,4 моль). Реакционную смесь 3 раза продували азотом с последующим добавлением Pd(dppf)Cl₂-CH₂Cl₂ (11,6 г, 14,2 ммоль). Реакционную смесь охлаждали до 0°C, добавляли по каплям диэтилцинк (1 M, 1,07 л) и реакционную смесь перемешивали при 70°C в течение 1 часа. Реакции объединяли, охлаждали до 20°C и медленно выливали в воду (7 л). К смеси добавляли водный раствор 4 M HCl до pH 6. Органический слой отделяли и водную фазу экстрагировали при помощи EtOAc (3 × 2 л). Объединенный органический слой промывали насыщенным соевым раствором (5 л), сушили над сульфатом натрия, концентрировали и очищали через слой силикагеля (элюировали смесью 50:1 петролейный эфир:EtOAc)) с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (900 г, 92% выход) в виде светло-желтого масла. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,29–7,43 (м, 5H), 6,94–6,97 (м, 1H), 6,82 (д, J=8,0 Гц, 1H), 6,70 (м, 1H), 5,09 (с, 2H), 2,52–2,58 (м, 2H), 1,17 (т, J=7,6 Гц, 3H).

(c) 1-(Бензилокси)-4-бром-5-этил-2-фторбензол (**1-4**)

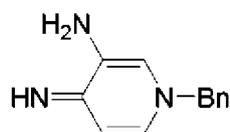
Четыре реакции осуществляли параллельно и объединяли. К раствору 2-(бензилокси)-4-этил-1-фторбензола (**1-3**) (293 г, 1,3 моль) в ACN (1 л) добавляли NBS (249 г, 1,4 моль) по порциям при 20°C. Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 2 часов. Реакционные смеси объединяли и концентрировали. Остаток разбавляли водой (5 л) и экстрагировали при помощи EtOAc (2 × 5 л). Органическую фазу промывали насыщенным соевым раствором (4 л), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали хроматографией на силикагеле (элюировали смесью петролейный эфир:EtOAc 100:1–10:1) с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (1,4 кг, 89% выход) в виде светло-желтого масла. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,29–7,38 (м, 5H), 7,2 (д, J=10,4 Гц, 1H), 6,8 (д, J=8,8 Гц, 1H), 5,06 (с, 2H), 2,6 (кв., J=7,6 Гц, 2H), 1,1 (т, J=7,6 Гц, 3H).

(d) 2-(4-(бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан (**1-5**)

Семь реакций осуществляли параллельно и объединяли для последующей

обработки. К раствору продукта предыдущей стадии (200 г, 647 ммоль) в диоксане (2 л) добавляли ацетат калия (190 г, 1,9 моль), бис(пинаколато)дибор (181 г, 712 ммоль) и $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2\text{-CH}_2\text{Cl}_2$ (10,6 г, 12,9 ммоль) в атмосфере азота при 20°C. Смесь перемешивали при 120°C в течение 2 часов. Реакционные смеси объединяли, концентрировали, разбавляли водой (5 л) и экстрагировали при помощи EtOAc (3 × 4 л). Объединенную органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали хроматографией на силикагеле (элюировали смесью петролейный эфир: EtOAc 1:0–5:1) с получением указанного в заголовке соединения (1,35 кг, 84% выход) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,33–7,51 (м, 6H), 6,82 (д, $J=7,6$ Гц, 1H), 5,17 (с, 2H), 2,85 (кв., $J=7,6$ Гц, 2H), 1,33 (с, 12H), 1,15 (т, $J=7,6$ Гц, 3H).

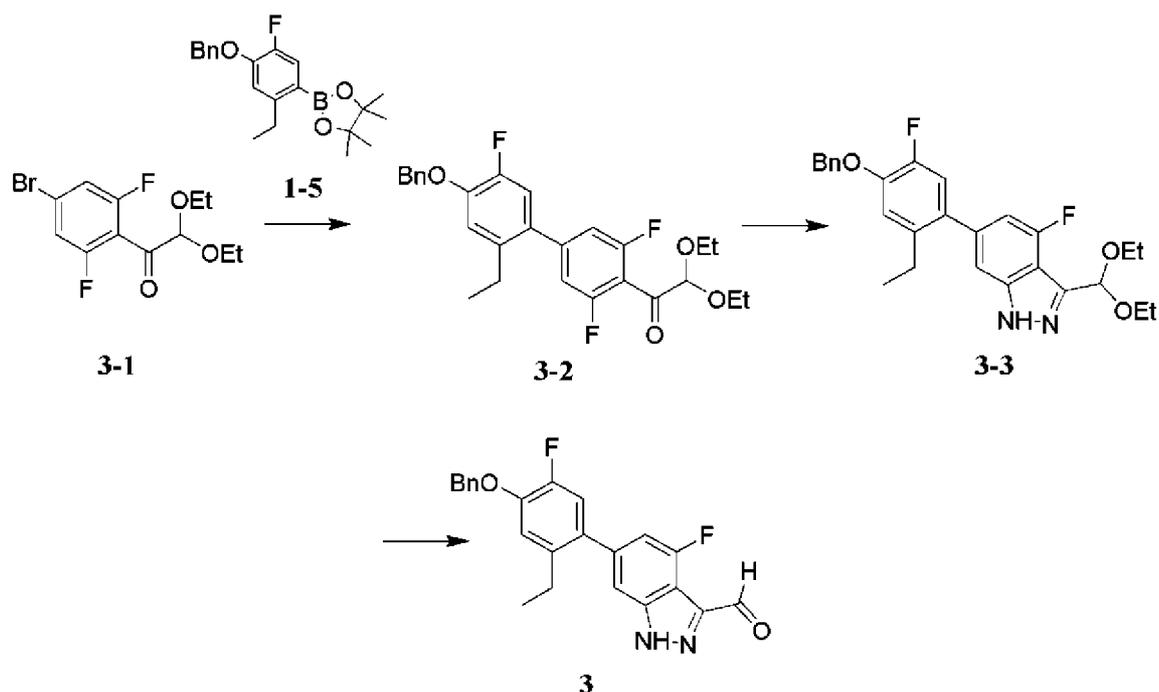
Получение 2: 1-Бензил-4-имино-1,4-дигидропиридин-3-амин (2)



2

К раствору пиридин-3,4-диамина (400 г, 3,67 моль) в ACN (3 л) добавляли бензилбромид (596 г, 3,49 моль) по порциям при 0°C и реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут и затем при 20°C в течение 12 часов и фильтровали. Фильтровальную лепешку промывали ACN (500 мл) и сушили с получением HBr соли указанного в заголовке соединения (600 г, 2,14 моль, 58% выход) в виде белого порошка. ^1H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 7,83 (д, $J=5,6$ Гц, 1H), 7,64 (с, 1H), 7,32–7,40 (м, 5H), 6,76 (д, $J=6,8$ Гц, 1H), 5,28 (с, 2H).

Получение 3: 6-(4-(Бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-4-фтор-1H-индазол-3-карбальдегид (3)



(а) 1-(4-Бром-2,6-дифторфенил)-2,2-диэтоксигетан-1-он (**3-1**)

Девять реакций осуществляли параллельно и объединяли для последующей обработки. Раствор 1-бром-3,5-дифторбензола (100 г, 518 ммоль) в THF (700 мл) дегазировали и продували азотом три раза. Затем добавляли 2 M LDA (311 мл) при -70°C и реакционную смесь перемешивали при -70°C в течение 0,5 часа в атмосфере азота. Добавляли по каплям раствор этил-2,2-диэтоксигетата (96 г, 544 ммоль) в THF (200 мл) при -70°C в атмосфере азота и реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа. Реакции объединяли и выливали в ледяной насыщенный раствор хлорида аммония (10 л) по порциям и экстрагировали при помощи EtOAc (3×3 л). Органический слой отделяли, промывали насыщенным солевым раствором (5 л), сушили над сульфатом натрия, концентрировали и очищали хроматографией на силикагеле (элюировали смесью петролейный эфир EtOAc 1:0-100:1) с получением указанного в заголовке соединения (1,26 кг, 84% выход) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,12 (д, $J=7,2$ Гц, 2H), 5,15 (с, 1H), 3,61-3,7 (м, 4H), 1,2 (т, $J=7,2$ Гц, 6H).

(б) 1-(4'-(бензилокси)-2'-этил-3,5,5'-трифтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2,2-диэтоксигетан-1-он (**3-2**)

Пять реакций осуществляли параллельно и объединяли для последующей обработки. К смеси 1-(4-бром-2,6-дифторфенил)-2,2-диэтоксигетан-1-она (**3-1**) (189 г, 586 ммоль) в этаноле (150 мл) и толуоле (1,5 л) добавляли воду (150 мл), карбонат натрия (84,8 г, 800 ммоль) и 2-(4-(бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан (**1-5**) (190 г, 533 ммоль) при 20°C . Суспензию дегазировали в вакууме и продували азотом несколько раз. Добавляли $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2\text{-CH}_2\text{Cl}_2$ (13 г, 16 ммоль) и реакционную смесь продували азотом несколько раз и перемешивали при 120°C в течение 2 часов. Реакции объединяли, охлаждали до 20°C , выливали в воду (5 л) и экстрагировали при помощи EtOAc (3×4 л). Объединенные органические слои промывали насыщенным

солевым раствором (5 л), сушили над сульфатом натрия, фильтровали, концентрировали и очищали хроматографией на силикагеле (элюировали смесью петролейный эфир:EtOAc 100:1–5:1) с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (880 г, 70% выход) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,36–7,48 (м, 5H), 6,94–6,96 (м, 2H), 6,86–6,92 (м, 2H), 5,29 (с, 1H), 5,19 (с, 2H), 3,67–3,77 (м, 4H), 2,52 (кв., $J=7,6$ Гц, 2H), 1,25 (т, $J=6,8$ Гц, 6H), 1,07 (т, $J=7,2$ Гц, 3H).

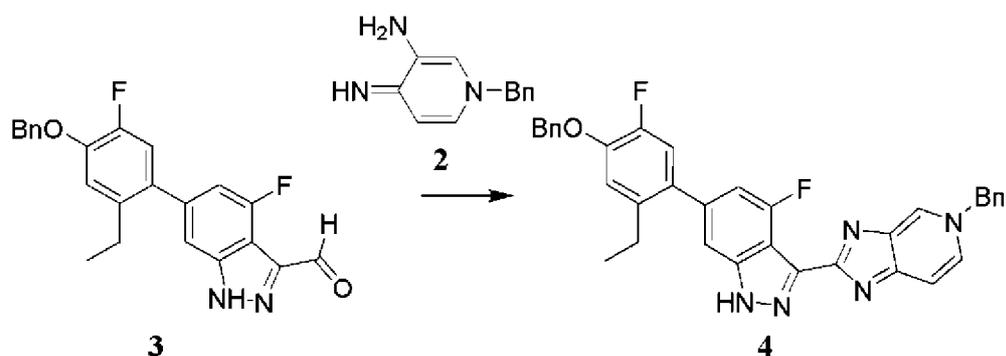
(с) 6–(4–(бензилокси)–2–этил–5–фторфенил)–3–(диэтоксиметил)–4–фтор–1H–индазол (3–3)

Четыре реакции осуществляли параллельно и объединяли для последующей обработки. К раствору продукта предыдущей стадии (220 г, 466 ммоль) в THF (2 л) добавляли гидразин моногидрат (47,6 г, 931 ммоль) при 20°C. Реакционную смесь перемешивали при 100°C в течение 12 часов. Четыре реакции объединяли и охлаждали до 20°C и концентрировали. Остаток растворяли в EtOAc (5 л) и промывали раствором 0,1 М HCl (2 × 1,5 л). Объединенные органические слои промывали насыщенным солевым раствором (1,5 л), сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (900 г, неочищенное) в виде желтой смолы, которое использовали непосредственно на следующей стадии. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,36–7,48 (м, 5H), 6,94–6,96 (м, 2H), 6,86–6,92 (м, 2H), 5,29 (с, 1H), 5,19 (с, 2H), 3,67–3,77 (м, 4H), 2,52 (кв., $J=7,6$ Гц, 2H), 1,25 (т, $J=6,8$ Гц, 6H), 1,07 (т, $J=7,2$ Гц, 3H).

(d) 6–(4–(Бензилокси)–2–этил–5–фторфенил)–4–фтор–1H–индазол–3–карбальдегид (3)

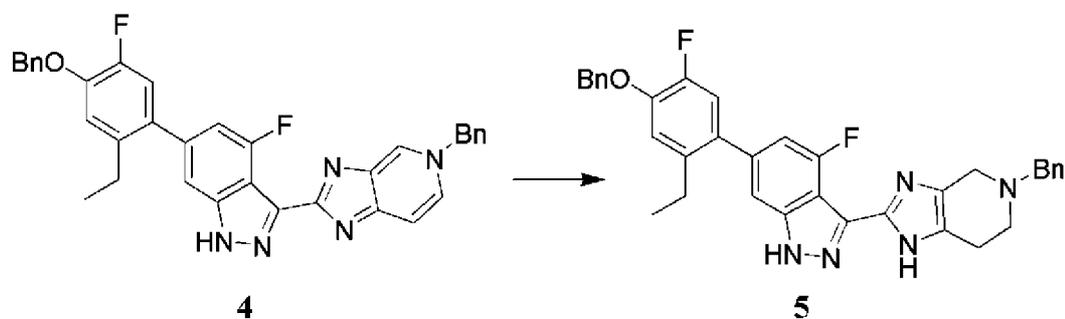
Три реакции осуществляли параллельно и объединяли для последующей обработки. К раствору продукта предыдущей стадии (300 г, 643 ммоль) в ацетоне (1,5 л) добавляли 4 М HCl (16 мл) по каплям при 20°C и реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 0,17 часа. Реакции объединяли, концентрировали, разбавляли при помощи МТВЕ (1 л) и фильтровали. Фильтровальную лепешку промывали МТВЕ (2 × 300 мл) и сушили при пониженном давлении с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (705 г, неочищенное) в виде желтого твердого вещества, которое использовали непосредственно на следующей стадии. (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ рассчитано для $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_2$ 393,13 найдено 393,1. ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ 14,51 (с, 1H), 10,17 (д, $J=3,6$ Гц, 1H), 7,50 (д, $J=7,2$ Гц, 2H), 7,40–7,42 (м, 4H), 7,24 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,15 (д, $J=12,4$ Гц, 1H), 7,06 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 5,25 (с, 2H), 2,52–2,53 (м, 2H), 1,03 (т, $J=7,6$ Гц, 3H).

Получение 4: 5–Бензил–2–(6–(4–(бензилокси)–2–этил–5–фторфенил)–4–фтор–1H–индазол–3–ил)–5H–имидазо[4,5–с]пиридин (4)



Четыре реакции осуществляли параллельно и объединяли для последующей обработки. К раствору 6-(4-(бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-4-фтор-1H-индазол-3-карбальдегида (**3**), продукта Получения 3 (172 г, 440 ммоль), в DMF (1,1 л) добавляли бисульфит натрия (68,6 г, 659 ммоль) и 1-бензил-4-имино-1,4-дигидропиридин-3-амин (**2**) (136 г, 484 ммоль) при 20°C и реакционную смесь перемешивали при 150°C в течение 2 часов. Четыре реакции объединяли и реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток выливали в воду (10 л) и фильтровали. Фильтровальную лепешку сушили при пониженном давлении с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (990 г, неочищенное) в виде желтого твердого вещества, которое использовали непосредственно без очистки. (m/z): [M+H]⁺ рассчитано для C₃₅H₂₇F₂N₅O 572,2 найдено 572,3.

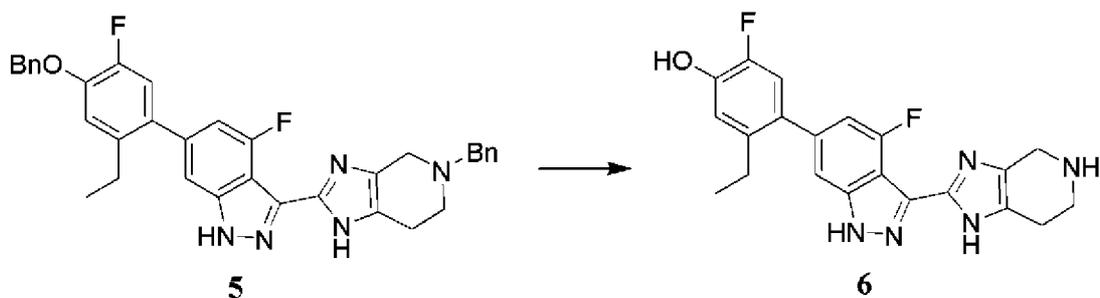
Получение 5: 5-Бензил-2-(6-(4-(бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-4-фтор-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-с]пиридин (5)



Три реакции осуществляли параллельно и объединяли для последующей обработки. К смеси 5-бензил-2-(6-(4-(бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-4-фтор-1H-индазол-3-ил)-5H-имидазо[4,5-с]пиридина (**4**), продукта Получения 4 (330 г, 577 ммоль), в метаноле (1,5 л) и THF (1 л) добавляли борогидрид натрия (267 г, 6,9 моль) по порциям при 20°C и реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 24 часов. Три реакции объединяли и реакционную смесь добавляли в воду (10 л), перемешивали в течение 10 минут и фильтровали. Фильтрат экстрагировали при помощи EtOAc (2 × 5 л) и объединенную органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт разбавляли при помощи EtOAc (2 л), перемешивали в течение 30 минут и фильтровали. Фильтровальную лепешку промывали МТВЕ (3 × 200 мл) с получением указанного в заголовке

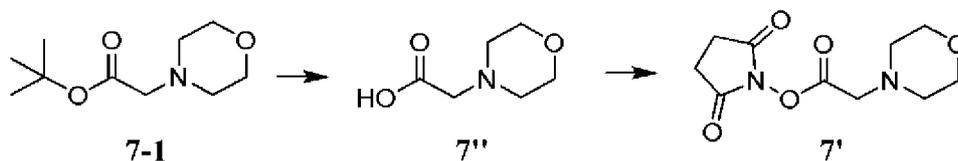
промежуточного соединения (275 г, 28% выход) в виде светло-желтого твердого вещества. (m/z): $[M+H]^+$ рассчитано для $C_{35}H_{31}F_2N_5O$ 576,25 найдено 576,3. 1H ЯМР (400 МГц, $DMSO-d_6$) δ 7,50–7,52 (м, 2H), 7,35–7,43 (м, 7H), 7,23–7,25 (м, 3H), 7,15 (д, $J=12,0$ Гц, 1H), 6,81 (д, $J=12,0$ Гц, 1H), 5,25 (с, 2H), 3,72 (с, 2H), 3,43 (ушир.с, 2H), 2,78 (ушир.с, 2H), 2,66 (ушир.с, 2H), 2,55 (кв., 2H), 1,04 (т, $J=7,6$ Гц, 3H).

Получение 6: 5-Этил-2-фтор-4-(4-фтор-3-(4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-ил)-1H-индазол-6-ил)фенол (6)



Пять реакций осуществляли параллельно и объединяли для последующей обработки. К смеси 5-бензил-2-(6-(4-(бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-4-фтор-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-с]пиридина (5), продукта Получения 5 (55 г, 95,5 ммоль), в THF (500 мл) и метаноле (500 мл) добавляли палладий на углероде (15 г, 9,6 ммоль) и водный раствор 12 М HCl (10 мл). Суспензию дегазировали в вакууме, продували водородом несколько раз и перемешивали в атмосфере водорода (50 ф/дюйм² (3,5 кг/см²)) при 50°C в течение 12 часов. Реакции объединяли и реакционную смесь фильтровали. Фильтрат концентрировали в вакууме с получением HCl соли указанного в заголовке промежуточного соединения (150 г, неочищенное) в виде не совсем белого твердого вещества. (m/z): $[M+H]^+$ рассчитано для $C_{21}H_{19}F_2N_5O$ 396,16 найдено 396,2. 1H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 7,43 (с, 1H), 7,07 (д, $J=11,6$ Гц, 1H), 6,97 (д, $J=11,6$ Гц, 1H), 6,91 (д, $J=8,8$ Гц, 1H), 4,57 (с, 2H), 3,74 (с, 2H), 3,24 (с, 2H), 2,55 (кв., $J=7,6$ Гц, 2H), 1,08 (т, $J=7,6$ Гц, 3H).

Получение 7: 2,5-диоксопирролидин-1-ил-2-морфолиноацетат (7')



(а) *трет*-Бутил-2-морфолиноацетат (7-1)

К смеси морфолина (160 г, 1,84 моль) и карбоната калия (381 г, 2,76 моль) в THF (3 л) добавляли *трет*-бутил-2-бромацетат (341 г, 1,75 моль) медленно при 0°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут и затем при 20°C в течение 12 часов и концентрировали. Добавляли воду (1,5 л) и реакционную смесь экстрагировали при помощи EtOAc (3 × 1 л). Органический слой отделяли, промывали насыщенным соевым раствором (500 мл), сушили над сульфатом натрия и концентрировали с

получением указанного в заголовке промежуточного соединения (300 г, 81% выход) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 3,74 (т, $J=4,8$ Гц, 4H), 3,10 (с, 2H), 2,57 (т, $J=4,8$ Гц, 4H), 1,46 (с, 9H).

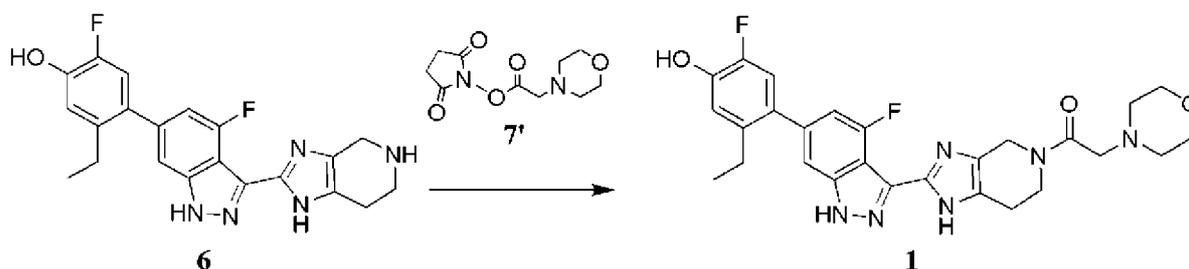
(b) 2-Морфолиноуксусная кислота (7'')

Смесь продукта предыдущей стадии (7-1) (300 г, 1,49 моль) в 3 М HCl в диоксане (2,0 л) перемешивали при 20°C в течение 12 часов и концентрировали с получением HCl соли указанного в заголовке соединения (270 г, 99% выход) в виде бледного твердого вещества, которое использовали непосредственно на следующей стадии ^1H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 4,13 (с, 2H), 3,93 (ушир.с, 4H), 3,64 (ушир.с, 4H).

(c) 2,5-диоксопирролидин-1-ил-2-морфолиноацетат (7')

Смесь продукта предыдущей стадии (150 г, 826 ммоль), 1-гидрокси-пирролидин-2,5-диона (95 г, 826 ммоль), DCC (256 г, 1,24 моль) и DIPEA (160 г, 1,24 моль) в DCM (2 л) перемешивали при 15°C в течение 12 часов и фильтровали. Фильтрат концентрировали и промывали при помощи EtOAc (800 мл). Твердое вещество собирали фильтрованием и концентрировали с получением указанного в заголовке соединения (150 г, 75% выход) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ 3,68 (с, 2H), 3,58 (т, $J=4,8$ Гц, 4H), 2,82 (с, 4H), 2,57 (т, $J=5,2$ Гц, 4H).

Пример 1: 1-(2-(6-(2-Этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-4-фтор-1H-индазол-3-ил)-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)-2-морфолиноэтан-1-он (1)



Смесь 5-этил-2-фтор-4-(4-фтор-3-(4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-ил)-1H-индазол-6-ил)фенола (6) 2 HCl (100 г, 214 ммоль), 2,5-диоксопирролидин-1-ил-2-морфолиноацетата (7') (67,2 г, 278 ммоль) и DIPEA (69 г, 534 ммоль) в DMF (600 мл) перемешивали при 15°C в течение 12 часов и фильтровали. Раствор очищали обращенно-фазовой хроматографией (устройство Agela FLEXATM FS-1L; 2 кг Agela C18 DAC колонка; 200 г образца, растворенного в DMF (900 мл); скорость потока 300 мл/мин; растворитель А вода, растворитель В ACN; градиент (% В, время (мин): 0/15, 0-40/45, 40/50) с получением указанного в заголовке соединения (50,0 г, 44,8% выход) в виде светло-желтого твердого вещества. (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ рассчитано для $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_3$ 523,22 найдено 523,0. ^1H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 7,22 (с, 1H), 6,80-6,96 (м, 3H), 4,68-4,78 (м, 2H), 3,96 (с, 2H), 3,65-3,95 (м, 4H), 3,35-3,38 (м, 2H), 2,77-2,92 (м, 2H), 2,52-2,56 (м, 6H), 1,06 (т, $J=7,6$ Гц, 3H).

Пример 2: Кристаллический 1-(2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-4-фтор-1H-индазол-3-ил)-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)-2-

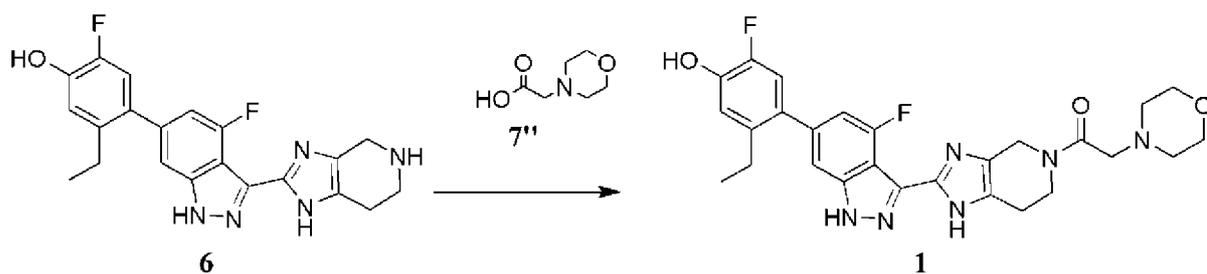
морфолиноэтан-1-он (1) Форма 1

В 250-мл колбу добавляли 1-(2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-4-фтор-1H-индазол-3-ил)-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)-2-морфолиноэтан-1-он (1), продукт Примера 1 (5 г), и этанол (50 мл) и реакционную смесь перемешивали при 50–80°C в течение 10 минут и затем медленно добавляли ACN (75 мл) при 50–80°C с последующим добавлением затравочных кристаллов из Примера 3. Реакционную смесь перемешивали при 20–25°C в течение 18 часов. Полученное твердое вещество собирали фильтрованием и сушили при 50°C в вакууме в течение 18 часов с получением Формы 1 указанного в заголовке соединения (3,6 г, 72% выход)

Пример 3: Кристаллический 1-(2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-4-фтор-1H-индазол-3-ил)-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)-2-морфолиноэтан-1-он (1) Форма 1

Соединение 1, продукт Примера 1 (1 г), добавляли к этанолу (10 мл) и нагревали до растворения. Добавляли ацетонитрил (10 мл) и реакционную смесь перемешивали и нагревали и затем перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов, фильтровали и сушили при 50°C в вакууме в течение 18 часов с получением Формы 1 указанного в заголовке соединения (0,23 г).

Пример 4: 1-(2-(6-(2-Этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-4-фтор-1H-индазол-3-ил)-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)-2-морфолиноэтан-1-он (1)



N, N-диизопропилэтиламин (0,298 мл, 1,707 ммоль) добавляли к раствору 5-этил-2-фтор-4-(4-фтор-3-(4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-ил)-1H-индазол-6-ил)фенола (135 мг, 0,341 ммоль) (6), НАТУ (156 мг, 0,410 ммоль) и 2-морфолиноуксусной кислоты (7'') (54,5 мг, 0,376 ммоль) в DMF (0,5 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов. Добавляли гидроксид лития (49,1 мг, 2,049 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при 65°C в течение 1 часа и концентрировали в вакууме с получением прозрачной желтой жидкости. Неочищенную жидкость очищали препаративной ВЭЖХ с получением ТФА соли указанного в заголовке соединения (142 мг, 0,223 ммоль, 65,3% выход) в виде бежевого твердого вещества.

Пример 5: Кристаллический 1-(2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-4-фтор-1H-индазол-3-ил)-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)-2-морфолиноэтан-1-он (1) Форма 2

Соединение 1 Примера 1 (2,5 г) растворяли в DMSO (5 мл) при 60°C. Сразу после

получения гомогенного раствора к раствору добавляли MeOH (2,5 мл). Гомогенную смесь добавляли по каплям в течение 30 минут к предварительно смешанному раствору MeOH (12,75 мл) и H₂O (11,25 мл) при 75°C. После того, как вся смесь была добавлена, объединенную смесь оставляли для перемешивания при 75°C в течение 1 часа, при этом образовывалась кристаллическая суспензия. Добавляли по каплям H₂O (36 мл) в течение 2 часов при 75°C. После завершения добавления H₂O суспензию перемешивали при 75°C в течение 1 часа, затем медленно охлаждали до 20°C в течение 6 часов. Суспензию выдерживали при 20°C еще в течение 10 часов, затем фильтровали, промывали 70% H₂O/MeOH (10 мл), сушили при 50°C в вакууме в течение 18 часов с получением Формы 2 указанного в заголовке соединения (2,13 г).

Свойства твердых форм по изобретению

Образцы двух безводных форм, Формы 1 и Формы 2 1-(2-(6-(2-Этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-4-фтор-1Н-индазол-3-ил)-1,4,6,7-тетрагидро-5Н-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)-2-морфолиноэтан-1-она (1) Примеров 2 и 5, соответственно, анализировали с использованием методов рентгеновской порошковой дифракции (PXRD), дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), термогравиметрического анализа (TGA), динамической сорбции влаги (DMS) и микроскопии в поляризованном свете. Форму 2 также анализировали методом рентгеновской дифракции монокристаллов.

Пример 6: Рентгеновская порошковая дифракция

Рентгеновские порошковые дифрактограммы, показанные на Фиг. 1 и 6, получали с использованием рентгеновского дифрактометра Bruker D8-Advance с Cu-K α излучением ($\lambda=1,54051 \text{ \AA}$), напряжением на выходе 45 кВ и током 40 мА. Устройство работало в геометрии Брэгга-Бретано с входной щелью, щелью расходимости и щелью рассеивания, установленных для максимизации интенсивности на образце. Для измерения, небольшое количество порошка (5–25 мг) осторожно спрессовывали на держателе образца с получением ровной поверхности и подвергали рентгеновскому облучению. Образцы сканировали в режиме 2 θ -2 θ от 2° до 35° в 2 θ с размером шага 0,02° и скоростью сканирования 0,30° секунд на шаг. Сбор данных контролировали с использованием программы измерений Bruker DiffracSuite и анализировали с использованием программы Jade (версия 7.5.1). Устройство калибровали с использованием корундового стандарта, в пределах $\pm 0,02^\circ$ угла два-тета. Наблюдаемые положения пиков PXRD два-тета и межатомные расстояния показаны в Таблицах 1 и 2, соответственно для кристаллической Формы 1 и кристаллической Формы 2.

Таблица 1

PXRD данные для кристаллической Формы 1

2-Тета	d(Å)	Площадь	A%
7,69	11,49	5570	7,30
8,16	10,83	36847	48,60
8,97	9,85	75877	100,00

10,66	8,29	7323	9,70
11,46	7,72	5841	7,70
11,91	7,43	1496	2,00
15,29	5,79	7115	9,40
15,80	5,60	7841	10,30
16,70	5,31	14679	19,30
17,02	5,20	8024	10,60
18,00	4,92	17834	23,50
18,83	4,71	2658	3,50
20,18	4,40	18636	24,60
22,39	3,97	7067	9,30
22,98	3,87	9029	11,90
24,89	3,57	8561	11,30
26,54	3,36	7831	10,30

PXRD данные для кристаллической Формы 2

2-Тета	d(Å)	Площадь	A%
10,61	8,33	706299	100,00
10,85	8,15	192921	27,30
11,84	7,47	487816	69,10
13,32	6,64	97980	13,90
14,94	5,93	519386	73,50
16,14	5,49	110314	15,60
16,35	5,42	75483	10,70
17,69	5,01	197341	27,90
18,26	4,85	445270	63,00
18,43	4,81	152845	21,60
19,06	4,65	564088	79,90
19,20	4,62	427174	60,50
19,49	4,55	266328	37,70
20,72	4,28	72244	10,20
21,10	4,21	236517	33,50
21,94	4,05	287485	40,70
22,64	3,93	121406	17,20
23,64	3,76	152841	21,60
25,19	3,53	68220	9,70
28,08	3,17	139597	19,80

Пример 7: Термический анализ

Дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) осуществляли с использованием модуля TA Instruments Model Q-100 с контроллером Thermal Analyst. Данные собирали и анализировали с использованием программы TA Instruments Thermal Analysis. Образец каждой кристаллической формы точно отвешивали в закрытую крышкой алюминиевую чашу. После 5-минутного периода изотермического уравнивания при 5°C образец нагревали, используя линейное повышение температуры 10°C/мин от 0°C до 300°C.

Репрезентативная DSC термограмма Формы 1 кристаллической свободной формы по изобретению показана на Фиг. 7. Термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), полученная при скорости нагрева 10°C в минуту, демонстрирует пик в эндотермическом тепловом потоке, идентифицированный как переход в расплав, в

диапазоне от около 210°C до около 234°C, или в диапазоне от около 215°C до около 229°C, или в диапазоне от около 220°C до около 224°C. Кристаллическая форма характеризуется термограммой дифференциальной сканирующей калориметрии, полученной при скорости нагрева 10°C в минуту, которая показывает максимум в эндотермическом тепловом потоке с пиком при около 221,7°C или при 221,7±3°C.

Репрезентативная DSC термограмма Формы 2 кристаллической свободной формы по изобретению показана на Фиг. 2. Термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), полученная при скорости нагрева 10°C в минуту, демонстрирует пик в эндотермическом тепловом потоке, идентифицированный как переход в расплав, в диапазоне от около 268°C до около 277°C, или в диапазоне от около 270°C до около 275°C, или в диапазоне от около 271°C до около 274°C. Кристаллическая форма характеризуется термограммой дифференциальной сканирующей калориметрии, полученной при скорости нагрева 10°C в минуту, которая показывает максимум в эндотермическом тепловом потоке с пиком при около 272,6°C или при 272,6±2°C.

Термогравиметрический анализ (TGA) осуществляли с использованием модуля TA Instruments Model Q-50 с высокой разрешающей способностью. Данные собирали с использованием контроллера TA Instruments Thermal Analyst и анализировали с использованием программ TA Instruments Universal Analysis. Взвешенный образец помещали на платиновую чашу и сканировали при скорости нагрева 10°C от температуры окружающей среды до 300–350°C. Камеры весов и печи продували потоком азота в процессе использования.

Репрезентативная TGA кривая Формы 1 кристаллической свободной формы по изобретению показана на Фиг. 8. Кривая термогравиметрического анализа (TGA) на Фиг. 8 не показывает никакой существенной потери массы при температурах ниже температуры начала разложения при около 293°C.

Репрезентативная TGA кривая Формы 2 кристаллической свободной формы по изобретению показана на Фиг. 3. Кривая термогравиметрического анализа (TGA) на Фиг. 3 не показывает никакой существенной потери массы при температурах ниже температуры начала разложения при около 269°C.

Пример 8: Оценка методом динамической сорбции влаги

Определения методом динамической сорбции влаги (DMS) осуществляли с использованием работающих при атмосферном давлении микровесов VTI, системы SGA-100 (VTI Corp., Hialeah, FL 33016). Использовали взвешенный образец, и в начале анализа влажность имела самое низкое возможное значение (близко к 0% RH (относительной влажности)). DMS анализ состоял из начальной стадии сушки (0%RH) в течение 120 минут, с последующими двумя циклами сорбции и десорбции, со скоростью сканирования 5% RH/стадия в диапазоне влажности от 5% RH до 90% RH. DMS эксперимент осуществляли изотермически при 25°C.

Репрезентативная кривая DMS для Формы 1 кристаллической свободной формы по изобретению показана на Фиг. 9.

Кристаллическая Форма 1 показала небольшой гистерезис между двумя циклами сорбции и десорбции. Форма 1 показала увеличение массы около 0,99% в диапазоне влажности от 5% до 70% относительной влажности и около увеличение массы 1,32% в диапазоне влажности от 5% до 90% относительной влажности при комнатной температуре, как показано на Фиг. 9. Форма 1 считается слегка гигроскопичной.

Репрезентативная кривая DMS для Формы 2 кристаллической свободной формы по изобретению показана на Фиг. 4. Кристаллическая Форма 2 не показала никакого гистерезиса между двумя циклами сорбции и десорбции и показала исключительно малую склонность к гигроскопичности. Форма 2 показала увеличение массы около 0,12% в диапазоне влажности от 5% до 70% относительной влажности и увеличение массы около 0,18% в диапазоне влажности от 5% до 90% относительной влажности при комнатной температуре, как показано на Фиг. 4. Форма 2 считается негигроскопичной.

Пример 9: Рентгеновская дифракция монокристалла Формы 2

Данные собирали на Rigaku Oxford Diffraction Supernova Dual Source, Cu at Zero, Atlas CCD дифрактометре, снабженном охлаждающим устройством Oxford Cryosystems Cobra. Данные собирали с использованием Cu K α -излучения. Структуру определяли и уточняли с использованием пакета программ для кристаллографического анализа Bruker AXS SHELXTL. Полную информацию можно найти в CIF. Если не указано иное, атомы водорода, присоединенные к углероду, были расположены геометрически и делали возможным уточнение с параметром изотропного смещения. Атомы водорода, присоединенные к гетероатомам, были расположены в разностной карте Фурье, что обеспечивало возможность свободного уточнения с параметром изотропного смещения.

Таблица 3

Данные анализа рентгеновской дифракции монокристалла для Формы 2

Эмпирическая формула	C ₂₇ H ₂₈ F ₂ N ₆ O ₃
Масса формулы	522,55
Размер кристалла	0,14 × 0,10 × 0,02 мм ³
Температура для сбора данных	293(2) К
Длина волны, используемая для сбора данных	1,54178 Å
Кристаллическая система	Орторомбическая
Пространственная группа	<i>Pbca</i>
Параметры элементарной ячейки	<i>a</i> =9,7245(11) Å
	<i>b</i> =16,8197(14) Å
	<i>c</i> =32,604(4) Å
	α =90°
	β =90°
	γ =90°

Объем элементарной ячейки	5332,8(10) Å ³
Z (Количество молекул в элементарной ячейке)	8
Плотность (рассчитанная)	1,302 г/см ³
Тета диапазон для сбора данных	5,26–66,60°
Диапазоны индексов	–11 ≤ h ≤ 11 –12 ≤ k ≤ 20 –38 ≤ l ≤ 38
Собранные отражения	24516
Независимые отражения	4708 [$R_{int}=0,0927$]
Конечные R индексы [$F2 > 2\sigma(F2)$]	$R1=0,0808$, $wR2=0,2159$
R индексы (все данные)	$R1=0,1452$, $wR2=0,2859$

Пример 10: Оценка стабильности в твердом состоянии Формы 1

Образцы Формы 1 кристаллической свободной формы по изобретению хранили при 25°C и 60% относительной влажности (RH) и при 40°C и 75% RH в двух конфигурациях а) открытый стеклянный флакон и б) закрытый стеклянный флакон, размещенный внутри HDPE бутылки, содержащей осушитель. HDPE бутылку индукционно запаивали. С определенными интервалами содержимое репрезентативного образца извлекали и анализировали методом ВЭЖХ на химическую чистоту (показана ниже как ВЭЖХ чистота (% a/a)).

Таблица 4

Кристаллическая Форма 1, испытание на стабильность

Временная точка (недели)	Условия			
	40°C/75%RH Закрытый с осушителем	40°C/75%RH Открытый	25°C/ 60% RH Закрытый с осушителем	25°C/60%RH Н Открытый
0	98,73			
2	NT	98,72	NT	NT
4	98,75	98,70	98,75	98,75
8	98,80	98,97	98,87	98,75
24	99,06	98,89	99,02	98,78
36	98,86	98,71	98,80	98,75

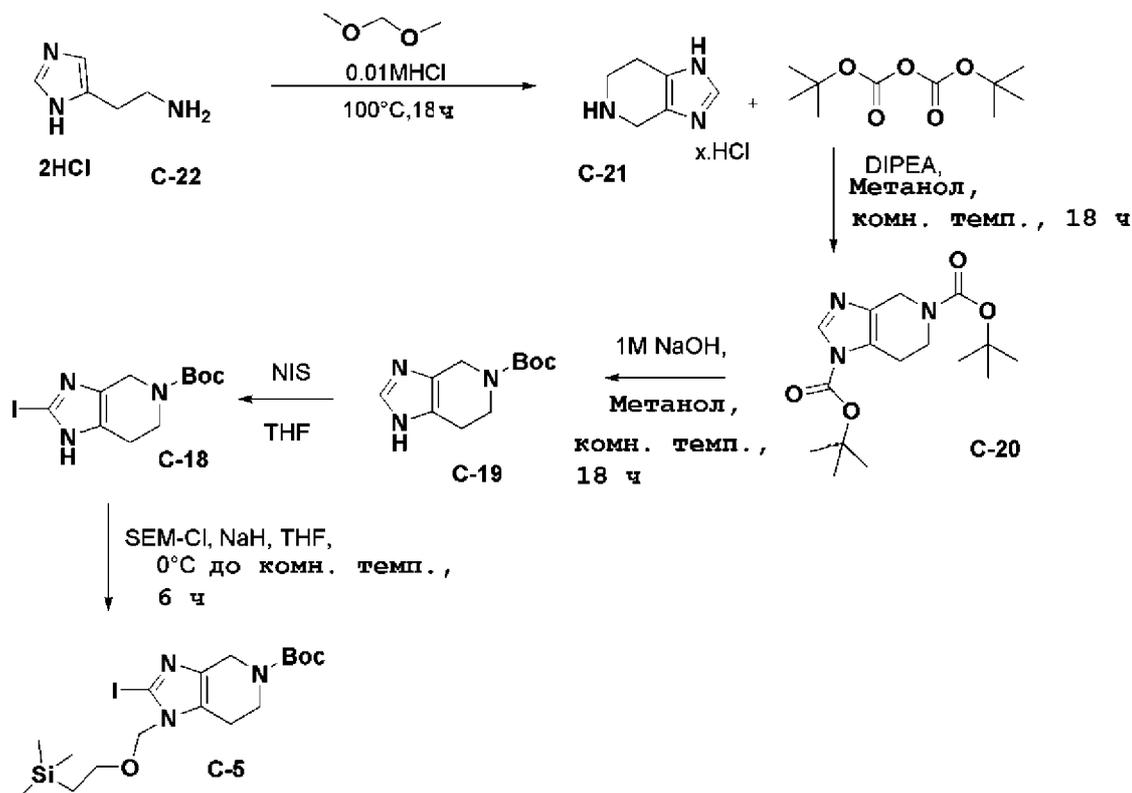
NT: не испытывали

Пример 11: Изображение Формы 1 и Формы 2, полученное методом микроскопии в поляризованном свете (PLM)

Образцы Формы 1 и Формы 2 исследовали под оптическим микроскопом (Olympus

ВХ51) с кросс-поляризованным светофильтром. Изображения получали при помощи камеры PaxCam, управляемой программой PaxIt Imaging Software (версия 6.4). Образцы подготавливали на предметных стеклах со светлым минеральным маслом в качестве иммерсионной среды. В зависимости от размера частиц для увеличения использовали объектив с линзой 4x, 10x или 20x.

Получение 8: трет-бутил-2-иод-1-((2-(триметилсилил)этокси)метил)-1,4,6,7-тетрагидро-5Н-имидазо[4,5-с]пиридин-5-карбоксилат (С-5)



К раствору соединения C-22 (25 г, 135,86 ммоль) в 0,01M HCl (500 мл) добавляли диметоксиметан (21,64 мл, 244,54 ммоль). Полученный раствор перемешивали при 100°C в течение 18 часов. Растворитель удаляли в вакууме и остаток растирали в порошок два раза с диэтиловым эфиром и этанолом, фильтровали и сушили с получением соединения C-21 (25,2 г, 94,6% выход).

К раствору соединения C-21 (25,0 г, 127,55 ммоль) в метаноле (250 мл) добавляли DIPEA (57,23 мл, 318,87 ммоль) с последующим добавлением (Boc)₂O (68,23 мл, 318,87 моль) и реакцию смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. Полученную реакцию смесь разбавляли водой (150 мл) и экстрагировали с использованием этилацетата (3×200 мл). Объединенный органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, декантировали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта C-20, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

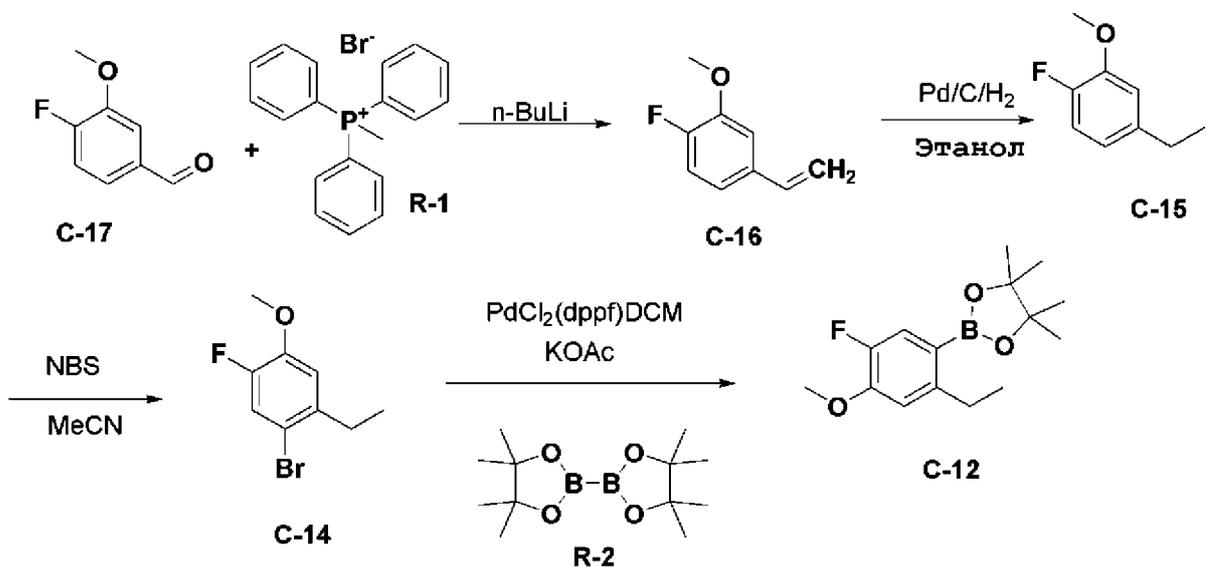
К раствору этого неочищенного соединения C-20 (40,0 г, 123,8 ммоль) в метаноле (500 мл) добавляли 1M NaOH раствор (200 мл) и полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. Растворитель отгоняли в вакууме и

полученное неочищенное вещество разбавляли водой (200 мл) и экстрагировали с использованием этилацетата (3×300 мл). Объединенный органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали колоночной хроматографией (100–200 силикагель), элюировали смесью 5–10% MeOH:DCM с получением желаемого продукта **C–19** (20 г, 72,4% выход).

К раствору соединения **C–19** (20 г, 89,68 ммоль) в THF (400 мл) добавляли NIS (30,26 г, 134,52 ммоль) при комнатной температуре и полученный раствор перемешивали в течение 2 часов при этой же температуре. Реакционную смесь разбавляли водой (200 мл) и экстрагировали этилацетатом (2×300 мл), органический слой промывали 10% водным раствором тиосульфата натрия (3×100 мл), затем насыщенным соевым раствором, сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта **C–18**, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

К перемешиваемому раствору соединения **C–18** (15,0 г, 42,97 ммоль) в THF (150 мл) добавляли NaN (1,8 г 45,11 ммоль) при 0°C по порциям и реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем добавляли по каплям SEM хлорид (8,18 мл, 45,11 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 6 часов при комнатной температуре. Развитие реакции отслеживали при помощи ТСХ, реакцию гасили ледяной водой (200 мл) при 0°C и экстрагировали этилацетатом (2×200 мл). Объединенный органический слой промывали насыщенным соевым раствором и сушили над безводным сульфатом натрия. Органический слой фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали колоночной хроматографией на (100–200) силикагеле (элюировали смесью 10–15% EtOAc:гексан) с получением желаемого продукта **C–5** в виде вязкой жидкости (11 г, 55%).

Получение 9: 2-(2-этил-5-фтор-4-метоксифенил)-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан (C–12)



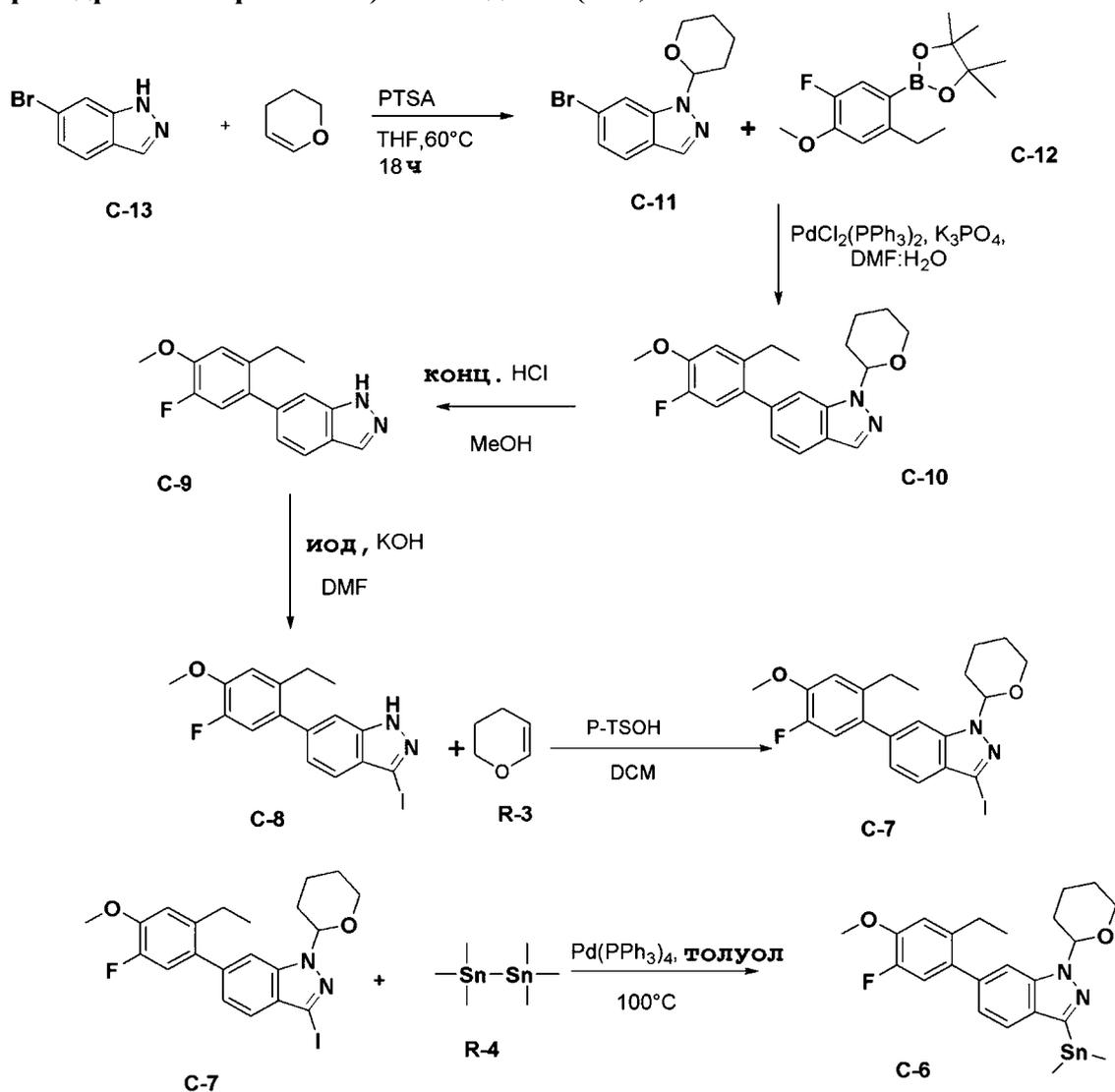
К перемешиваемой суспензии соединения **C-17** (347,6 г, 973,14 ммоль) в безводном THF (1000 мл), охлажденном до -40°C , добавляли *n*-бутиллитий (2,5 М в гексане, 362,6 мл, 905,02 ммоль) в течение 50 минут, и при этом сохранялся характерный желтый цвет илида фосфора. Реакционную смесь нагревали до -10°C и перемешивали в течение 1 часа, затем смесь охлаждали до -30°C и добавляли раствор соединения **R-1** (50 г, 324,38 ммоль) в безводном THF (200 мл) в течение 30 минут. Полученную смесь нагревали до температуры окружающей среды и перемешивали в течение ночи. Развитие реакции отслеживали при помощи ТСХ. После завершения реакцию гасили путем постепенного добавления воды (500 мл) и экстрагировали диэтиловым эфиром (3×500 мл). Объединенный органический слой промывали водой (2×500 мл), насыщенным соевым раствором (250 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного соединения. Полученный неочищенный продукт **C-16** использовали на следующей стадии без очистки.

К раствору неочищенного **C-16** (110 г, 723,39 ммоль) в этаноле (1000 мл) добавляли 10% Pd/C (50 г). Устанавливали баллон газообразного водорода и реакционную смесь вакуумировали и снова заполняли водородом три раза. Реакционную смесь перемешивали в атмосфере водорода в течение ночи при комнатной температуре. После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи реакция завершилась. Смесь фильтровали через слой целита и концентрировали в вакууме с получением неочищенного соединения, которое очищали колоночной хроматографией на силикагеле (100–200), элюировали с использованием смеси 3–5% этилацетата/гексан с получением желаемого продукта **C-15** в виде бесцветной жидкости (24 г, 48% за 2 стадии).

К раствору соединения **C-15** (24,0 г, 155,84 ммоль) в MeCN (200 мл) добавляли раствор NBS (28,0 г, 157,40 ммоль) в MeCN (100 мл). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. Растворитель удаляли в вакууме и остаток разбавляли диэтиловым эфиром (100 мл). Наблюдали образование осадка, который удаляли фильтрованием, и фильтрат промывали водным раствором сульфита натрия (200 мл) и насыщенным соевым раствором (100 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали в вакууме с получением желаемого продукта **C-14** в виде желтого масла (35,0 г, 97% выход).

К раствору соединения **C-14** (20 г, 85,836 ммоль) в диоксане (400 мл) добавляли соединение **R-2** (32,69 г, 128,755 ммоль) и KOAc (25,27 г, 257,508 ммоль). Реакционную смесь дегазировали азотом в течение 15 минут, затем добавляли палладиевый катализатор (3,5 г, 4,29 ммоль). Реакционную смесь перемешивали и нагревали при 110°C в течение 3 часов. Реакционную смесь фильтровали через слой целита и промывали этилацетатом. Фильтрат разбавляли этилацетатом (200 мл) и промывали водой (2×200 мл) и насыщенным соевым раствором (100 мл), сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме. Полученный неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией (100–200 силикагель), элюировали смесью 3–5% EtOAc:гексан с получением желаемого продукта **C-12** (20 г, 83% выход).

Получение 10: 3-(диметил-станнил)-6-(2-этил-5-фтор-4-метоксифенил)-1-(тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)-1Н-индазол (С-6)



Смесь соединения **C-13** (25 г, 126,84 ммоль), 3,4-дигидро-2Н-пирана (134,5 мл, 1471,5 мл) и р-TSA (5,57 г, 29,18 ммоль) поглощали в THF (700 мл) и нагревали при 60°C в течение ночи. Реакционную смесь выливали в ледяную воду и водную фазу экстрагировали этилацетатом. Органический слой сушили над сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении и остаток очищали на колонке с силикагелем (230–400) (элюируя смесью 1–2% этилацетата в гексане) с получением желаемого соединения **C-11** (23,5 г, 67% выход).

Раствор соединения **C-11** (13,3 г, 47,5 ммоль), соединения **C-12** (15,96 г, 57,0 ммоль) и K_3PO_4 (30,21 г, 142,5 ммоль) в $\text{DMF}:\text{H}_2\text{O}$ (396:99 мл) дегазировали азотом в течение 15 минут, затем добавляли палладиевый катализатор (1,6 г, 2,37 ммоль) и реакционную смесь продували азотом в течение 5 минут. Полученную реакционную смесь нагревали при 100°C в течение 12 часов при постоянном перемешивании. Реакционную смесь фильтровали через слой целита и промывали этилацетатом. Фильтрат разбавляли этилацетатом (200 мл), экстрагировали при помощи EtOAc (2×100 мл) и промывали

холодной водой (100 мл) и насыщенным соевым раствором (50 мл), сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме с получением неочищенного продукта, который очищали флэш-хроматографией (100–200 силикагель), элюировали смесью 10% EtOAc:гексан с получением **C-10** (14 г, 91,4% выход).

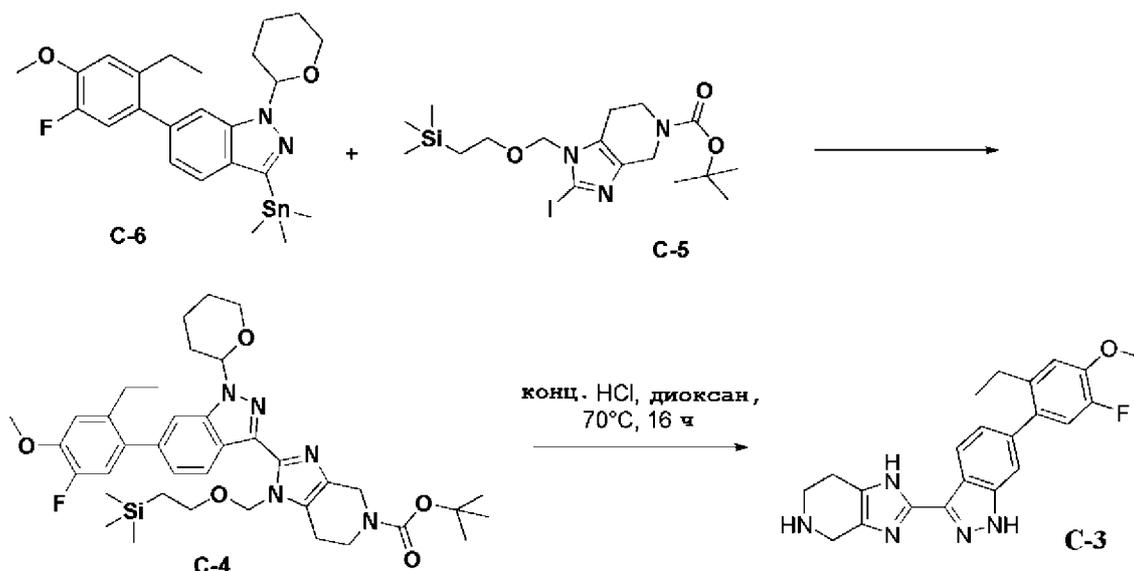
К раствору соединения **C-10** (52 г, 146,89 ммоль) в метаноле (600 мл) добавляли концентрированную HCl (50 мл) и полученный раствор нагревали при 60°C в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали в вакууме. Остаток разбавляли при помощи EtOAc (200 мл) и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃ (2×150 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением желаемого продукта **C-9** (35 г, 88,9% выход).

К раствору соединения **C-9** (17,5 г, 64,81 ммоль) в DMF (100 мл) добавляли KOH (14,5 г, 259,54 ммоль) и смесь перемешивали в течение 15 минут. Медленно добавляли раствор иода (32,7 г, 129,62 ммоль) в DMF (50 мл) при 0°C и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Развитие реакции отслеживали при помощи ТСХ, затем реакционную смесь разбавляли водой (200 мл) и экстрагировали этилацетатом (2×200 мл). Органический слой промывали насыщенным водным раствором метабисульфита натрия (2×150 мл) и водой (3×100 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме с получением неочищенного продукта **C-8** (21 г).

К раствору **C-8** (21,0 г, 53,02 ммоль) в DCM (230 мл) добавляли p-TsOH (1,8 г, 10,60 ммоль) и смесь охлаждали до 0°C. К этому раствору добавляли по каплям соединение **R-3** (7,04 мл, 79,54 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. ТСХ анализ показал завершение реакции. Реакционную смесь разбавляли DCM (2×150 мл) и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃ (200 мл) и насыщенным соевым раствором (200 мл). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме с получением неочищенного продукта, который очищали флэш-хроматографией с получением **C-7**.

Раствор **C-7** (10,0 г, 20,83 ммоль) в толуоле (200 мл) дегазировали азотом в течение 20 минут с последующим добавлением **R-4** (4,89 мл, 22,91 ммоль) и Pd(PPh₃)₄ (1,2 г, 1,04 ммоль). Реакционную смесь продували азотом еще в течение 5 минут и затем перемешивали при 100°C. Через 2 часа ТСХ анализ показал завершение реакции. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через слой Целита и остаток промывали этилацетатом. Концентрированный фильтрат очищали колоночной хроматографией (нейтральный оксид алюминия), элюировали смесью 2–5% EtOAc:гексан с получением продукта **C-6** (6,4 г, 57,6% выход).

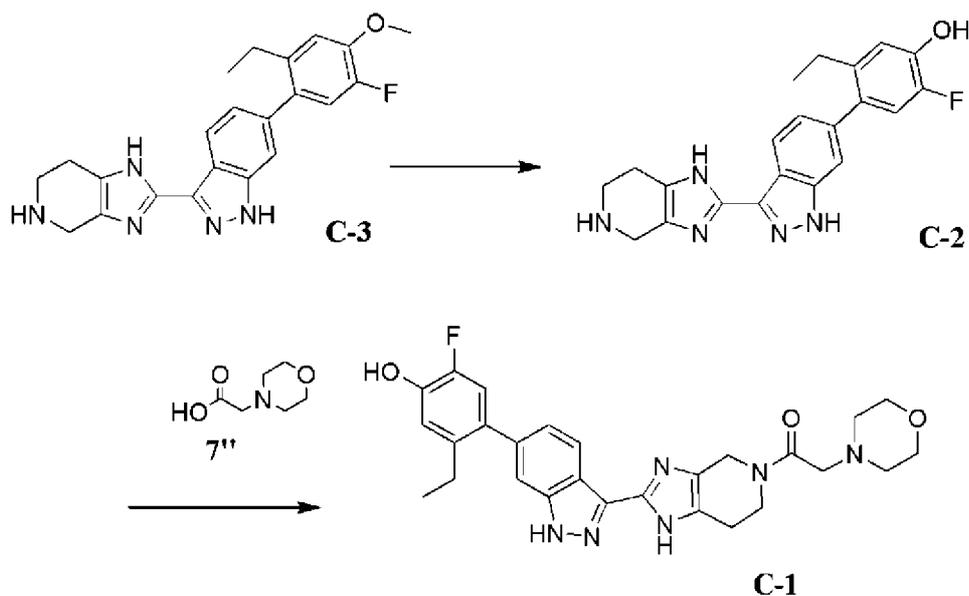
Получение 11: 2-(6-(2-этил-5-фтор-4-метоксифенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-c]пиридин (C-3)



К раствору соединения **C-6** (6,4 г, 12,37 ммоль) в толуоле (100 мл) добавляли соединение **C-5** (5,9 г, 12,37 ммоль). Реакционную смесь дегазировали азотом в течение 20 минут с последующим добавлением иодида меди (I) (470 мг, 2,47 ммоль) и $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (714 мг, 1,237 ммоль), затем перемешивали при 100°C в течение 12 часов. Развитие реакции отслеживали при помощи ТСХ. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через слой Целита, остаток промывали этилацетатом. Органический слой разбавляли водой, разделяли и органическую часть промывали насыщенным солевым раствором, сушили над Na_2SO_4 и фильтровали. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали колоночной хроматографией (силикагель, размер 100–200 меш), элюировали смесью 20% EtOAc :гексан с получением **C-4** (4 г, 45,9%).

К раствору соединения **C-4** (4,0 г, 5,6 ммоль) в диоксане (30 мл) добавляли концентрированную HCl (30 мл). Реакционную смесь перемешивали при 70°C в течение 16 часов. Развитие реакции отслеживали при помощи ЖХМС. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, концентрировали в вакууме, растирали в порошок с диэтиловым эфиром и очищали препаративной ВЭЖХ с получением желаемого соединения **C-3** (0,65 г, 29,5%).

Пример 12: 1-(2-(6-(2-Этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-c]пиридин-5-ил)-2-морфолиноэтан-1-он (**C-1**)



К смеси **C-3** (180 мг, 0,460 ммоль) в DCM (0,5 мл) при комнатной температуре добавляли раствор 1М трибромида бора в DCM [100 мл] (2,299 мл, 2,299 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 30 минут, затем концентрировали. Полученный остаток совместно упаривали с MeOH (3×3,0 мл), снова растворяли в 1:1 смеси AcOH:H₂O (3,0 мл), фильтровали и очищали обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ. Желаемые фракции объединяли и сушили замораживанием с получением **C-2** ((5-этил-2-фтор-4-(3-(4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-ил)-1H-индазол-6-ил)фенол) в виде TFA соли.

К смеси **C-2** TFA (15 мг, 0,031 ммоль) и **7''** (2 эквивалента, 0,061 ммоль) в DMF (0,5 мл) при комнатной температуре добавляли NATU (25,5 мг, 0,067 ммоль) и DIEA (0,043 мл, 0,244 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли MeOH (0,5000 мл) и водой (0,500 мл). Добавляли LiOH (2,193 мг, 0,092 ммоль). Полученную смесь нагревали при 65°C в течение 1 часа. Реакционную смесь затем концентрировали, полученный остаток обрабатывали смесью DCM (0,500 мл) и TFA (0,500 мл) при комнатной температуре в течение 30 минут, концентрировали, снова растворяли в 1:1 смеси AcOH:H₂O (1,5 мл), фильтровали и очищали обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ с получением соединения **C-1** в виде TFA соли. (m/z): [M+H]⁺ рассчитано для C₂₇H₂₉FN₆O₃ 504,23 найдено 505,2.

Биологические анализы

Соединение **1** охарактеризовано в одном или нескольких из следующих биологических анализов.

Анализ 1: Биохимические анализы JAK киназ

Панель из четырех LanthaScreen биохимических анализов JAK (JAK1, 2, 3 и Tyk2) осуществляли в обычном буфере для киназной реакции (50 mM HEPES, pH 7,5, 0,01% Brij-35, 10 mM MgCl₂ и 1 mM EGTA). Рекомбинантные GST-меченные JAK ферменты и GFP-меченный STAT1 пептидный субстрат получали от Life Technologies.

Серийно разведенное соединение предварительно инкубировали с каждым из четырех JAK ферментов и субстратом в белых 384-луночных микропланшетах (Corning) при температуре окружающей среды в течение 1 часа. Затем добавляли АТФ для инициирования киназных реакций в общем объеме 10 мл, с 1% DMSO. Конечные концентрации ферментов для JAK1, 2, 3 и Tyk2 составляли 4,2 нМ, 0,1 нМ, 1 нМ и 0,25 нМ, соответственно; соответствующие используемые Km АТФ концентрации составляли 25 мМ, 3 мМ, 1,6 мМ и 10 мМ; при этом концентрация субстрата составляла 200 нМ для всех четырех анализов. Киназным реакциям давали осуществиться в течение 1 часа при температуре окружающей среды, затем добавляли 10 мкл препарата EDTA (конечная концентрация 10 мМ) и Тб-анти-pSTAT1 (pTyr701) антитело (Life Technologies, 2 нМ конечная концентрация) в TR-FRET буфере для разведения (Life Technologies). Планшеты оставляли для инкубации при температуре окружающей среды в течение 1 часа, затем считывали на планшет-ридере EnVision (Perkin Elmer). Сигналы эмиссии (520нм/495нм) регистрировали и использовали для расчета процента ингибирования на основании DMSO и фоновых контролей.

Для анализа доза-ответ проценты ингибирования наносили на график против концентраций соединения и IC₅₀ значения определяли из 4-параметрической робастной модели подгонки с использованием программы Prism (GraphPad Software). Результаты выражали как pIC₅₀ (отрицательный логарифм IC₅₀) и затем преобразовывали в pK_i (отрицательный логарифм константы диссоциации, K_i) с использованием уравнения Ченга-Прусоффа.

Соединение **1** показало следующую активность в отношении ферментов.

Таблица 5

JAK 1 pK_i	JAK 2 pK_i	JAK 3 pK_i	Tyk2 pK_i
10	10,6	9,7	8,7

Анализ 2: Клеточный анализ активности в отношении JAK: Ингибирование ИЛ-13

AlphaScreen клеточный анализ активности в отношении JAK1 осуществляли путем измерения интерлейкин-13 (ИЛ-13, R&D Systems)-индуцированного фосфорилирования STAT6 в эпителиальных клетках легкого человека BEAS-2B (ATCC). Анти-STAT6 антитело (Cell Signaling Technologies) конъюгировали с AlphaScreen акцепторными шариками (Perkin Elmer), тогда как анти-pSTAT6 (pTyr641) антитело (Cell Signaling Technologies) биотинилировали с использованием Сульфо-NHS-Биотина EZ-Link (Thermo Scientific).

BEAS-2B клетки выращивали при 37°C в 5% CO₂ увлажненном инкубаторе в 50% DMEM/50% F-12 среде (Life Technologies), дополненной 10% FBS (Hyclone), 100 Ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Life Technologies) и 2 мМ GlutaMAX (Life Technologies). В день 1 анализа клетки высевали при плотности 7500 клеток/лунка в белые

покрытые поли-D-лизином 384-луночные планшеты (Corning) с 25 мкл среды и оставляли в инкубаторе в течение ночи для адгезии. В день 2 анализа среду удаляли и заменяли на 12 мл аналитического буфера (сбалансированный солевой раствор Хэнка/HBSS, 25 mM HEPES и 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумин/BSA), содержащего доза-ответы испытываемых соединений. Соединение серийно разводили в DMSO и затем снова разбавляли 1000-кратно в среде для доведения конечной концентрации DMSO до 0,1%. Клетки инкубировали с испытываемыми соединениями при 37°C в течение 1 часа и затем добавляли 12 мкл предварительно нагретого IL-13 (80 нг/мл в аналитическом буфере) для стимуляции. После инкубации при 37°C в течение 30 минут аналитический буфер (содержащий соединение и IL-13) удаляли и добавляли 10 мкл буфера для лизиса клеток (25 mM HEPES, 0,1% SDS, 1% NP-40, 5 mM MgCl₂, 1,3 mM EDTA, 1 mM EGTA и дополненного ингибиторами протеаз Complete Ultra mini и PhosSTOP от Roche Diagnostics). Планшеты встряхивали при температуре окружающей среды в течение 30 минут перед добавлением реагентов для детекции. Сначала добавляли смесь биотин-анти-pSTAT6 и анти-STAT6-конъюгированных акцепторных шариков и инкубировали при температуре окружающей среды в течение 2 часов, с последующим добавлением стрептавидин-конъюгированных донорных шариков (Perkin Elmer). После минимум 2 часов инкубации аналитические планшеты считывали на планшет-ридере EnVision. Сигналы люминесценции AlphaScreen регистрировали и использовали для расчета процента ингибирования на основании DMSO и фоновых контролей.

Для анализа доза-ответ процент ингибирования наносили на график против концентраций соединения и определяли IC₅₀ значения из 4-параметрической робастной модели подгонки с использованием программы Prism. Результаты также могут быть выражены как отрицательный логарифм IC₅₀ значения, pIC₅₀. В этом анализе соединение **1** показало pIC₅₀ значение 7,9.

Анализ 3: Клеточный анализ активности в отношении JAK: Ингибирование IL-2/анти-CD3-стимулированного IFN γ в человеческих PBMC

Активность испытываемого соединения для ингибирования интерлейкин-2 (IL-2)/анти-CD3-стимулированного интерферона гамма (IFN γ) измеряли в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC), выделенных из человеческой цельной крови (Stanford Blood Center). Поскольку IL-2 передает сигналы через JAK, этот анализ обеспечивает определение активности в отношении JAK в клетках.

(1) Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли из человеческой цельной крови здоровых доноров с использованием градиента фиколла. Клетки культивировали в 37°C, 5% CO₂ увлажненном инкубаторе в RPMI (Life Technologies), дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки (FBS, Life Technologies), 2 mM Glutamax (Life Technologies), 25 mM HEPES (Life Technologies) и 1X пенициллина/стрептомицина (Life Technologies). Клетки высевали при плотности 200000 клеток/лунка в среду (50 мкл) и культивировали в течение 1 часа. Соединение серийно разводили в DMSO и затем снова разбавляли 500-кратно (до 2x

конечной анализируемой концентрации) в среде. Разведения испытываемого соединения (100 мкл/лунка) добавляли к клеткам и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 1 часа с последующим добавлением IL-2 (R&D Systems; конечная концентрация 100 нг/мл) и анти-CD3 (BD Biosciences; конечная концентрация 1 мкг/мл) в предварительно нагретой среде для количественного определения (50 мкл) в течение 24 часов.

(2) После стимуляции цитокинами клетки центрифугировали при 500 g в течение 5 минут и супернатанты удаляли и замораживали при -80°C. Для определения ингибиторной активности испытываемых соединений в ответ на IL-2/анти-CD3 измеряли концентрации IFN γ в супернатанте методом ELISA (R&D Systems). IC₅₀ значения определяли из анализа кривых ингибирования, представляющих концентрацию IFN γ против концентрации соединения. Данные выражены как pIC₅₀ (отрицательный десятичный логарифм IC₅₀) значения. В этом анализе соединение **1** показало pIC₅₀ значение около 6,7.

Анализ 4: Клеточный анализ активности в отношении JAK: Ингибирование IL-2-стимулированного pSTAT5 в CD4+ T-клетках

Активность испытываемого соединения для ингибирования интерлейкин-2 (IL-2)/анти-CD3-стимулированного фосфорилирования STAT5 измеряли в CD4-положительных (CD4+) T-клетках в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC), выделенных из человеческой цельной крови (Stanford Blood Center), с использованием проточной цитометрии. Поскольку IL-2 передает сигналы через JAK, этот анализ обеспечивает определение активности в отношении JAK в клетках.

CD4+ T-клетки идентифицировали с использованием фикоэритробилин (PE)-конъюгированного анти-CD4 антитела (Клон RPA-T4, BD Biosciences), тогда как Alexa Fluor 647-конъюгированное анти-pSTAT5 антитело (pY694, Клон 47, BD Biosciences) использовали для детекции фосфорилирования STAT5.

(1) Следовали протоколу Анализа 3, параграф (1), за исключением того, что стимуляцию цитокином с использованием IL-2/анти-CD3 осуществляли в течение 30 минут вместо 24 часов.

(2) После стимуляции цитокинами клетки фиксировали предварительно нагретым фиксирующим раствором (200 мкл; BD Biosciences) в течение 10 минут при 37°C, 5% CO₂, промывали два раза DPBS буфером (1 мл, Life Technologies) и ресуспендировали в ледяном Perm Буфере III (1000 мкл, BD Biosciences) в течение 30 минут при 4°C. Клетки промывали два раза 2% FBS в DPBS (FACS буфер) и затем ресуспендировали в FACS буфере (100 мкл), содержащем анти-CD4 PE (1:50 разведение) и анти-CD3 анти-CD3Alexa Fluor 647 (1:5 разведение), в течение 60 минут при комнатной температуре в темноте. После инкубации клетки промывали два раза в FACS буфере, затем анализировали с использованием проточного цитометра LSRII (BD Biosciences). Для определения ингибиторной активности испытываемого соединения в ответ на IL-2/анти-CD3, измеряли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) pSTAT5 в CD4+ T-клетках. IC₅₀ значения определяли из анализа кривых ингибирования, представляющих MFI против

концентрации соединения. Данные выражены как pIC_{50} (отрицательный десятичный логарифм IC_{50}) значения. В этом анализе соединение **1** показало pIC_{50} значение около 7,7.

Анализ 5: Клеточный анализ активности в отношении JAK: Ингибирование IL-6-стимулированного CCL2 (MCP-1) в человеческих PBMC

Активность испытываемого соединения для ингибирования интерлейкин-6 (IL-6)-стимулированной продукции CCL2 (MCP-1) измеряли в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMCs), выделенных из человеческой цельной крови (Stanford Blood Center). Поскольку IL-6 передает сигналы через JAK, этот анализ обеспечивает дистальное определение активности в отношении JAK в клетках.

(1) Следовали протоколу Анализа 3, параграф (1), для инкубации с испытываемыми соединениями. В этом анализе после добавления в лунки испытываемых соединений и инкубации добавляли IL-6 (R&D Systems; конечная концентрация 10 нг/мл) в предварительно нагретой среде для количественного определения (50 мкл).

(2) После стимуляции цитокинами в течение 48 часов клетки центрифугировали при 500 g в течение 5 минут и супернатанты удаляли и замораживали при $-80^{\circ}C$. Для определения ингибиторной активности испытываемого соединения в ответ на IL-6 измеряли концентрации CCL2 в супернатанте (MCP-1) методом ELISA (R&D Systems). IC_{50} значения определяли из анализа кривых ингибирования, представляющих концентрацию CCL2/MCP-1 против концентрации соединения. Данные выражены как pIC_{50} (отрицательный десятичный логарифм IC_{50}) значения. В этом анализе соединение **1** показало pIC_{50} значение около 6,4.

Анализ 6: Клеточный анализ активности в отношении JAK: Ингибирование IFN γ -индуцированного pSTAT1

Активность испытываемого соединения для ингибирования интерферон гамма (IFN γ)-стимулированного фосфорилирования STAT1 измеряли в CD14-положительных (CD14+) моноцитах, выделенных из человеческой цельной крови (Stanford Blood Center), с использованием проточной цитометрии. Поскольку IFN γ передает сигналы через JAK, этот анализ обеспечивает определение активности в отношении JAK в клетках.

Моноциты идентифицировали с использованием флуоресцеинизотиоцианат (FITC)-конъюгированного анти-CD14 антитела (Клон RM052, Beckman Coulter), а Alexa Fluor 647-конъюгированное анти-pSTAT1 антитело (pY701, Клон 4a, BD Biosciences) использовали для детекции фосфорилирования STAT1.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли из человеческой цельной крови здоровых доноров с использованием градиента фиколла. Клетки культивировали в $37^{\circ}C$, 5% CO_2 увлажненном инкубаторе в RPMI (Life Technologies), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Life Technologies), 2 mM Glutamax (Life Technologies), 25 mM HEPES (Life Technologies) и 1X пенициллина/стрептомицина (Life Technologies). Клетки высевали при плотности 250000 клеток/лунка в среду (200 мкл), культивировали в течение 2 часов и ресуспендировали в среде для количественного определения (50 мкл) (RPMI, дополненной 0,1% бычьего

сывороточного альбумина (Sigma), 2 mM Glutamax, 25 mM HEPES и 1X пенициллина/стрептомицина), содержащей различные концентрации испытываемых соединений. Соединения серийно разводили в DMSO и затем снова разбавляли 1000-кратно в среде для доведения конечной концентрации DMSO до 0,1%. Разведения испытываемого соединения инкубировали с клетками при 37°C, 5% CO₂, в течение 1 часа с последующим добавлением предварительно нагретого IFN γ (R&D Systems) в среде (50 мкл) при конечной концентрации 0,6 нг/мл в течение 30 минут. После стимуляции цитокинами клетки фиксировали предварительно нагретым фиксирующим раствором (100 мкл) (BD Biosciences) в течение 10 минут при 37°C, 5% CO₂, промывали два раза FACS буфером (1 мл) (1% BSA в PBS), ресуспендировали в смеси 1:10 анти-CD14 FITC:FACS буфер (100 мкл) и инкубировали при 4°C в течение 15 минут. Клетки промывали один раз и затем ресуспендировали в ледяном Perm Буфере III (BD Biosciences) (100 мкл) в течение 30 минут при 4°C. Клетки промывали два раза FACS буфером и затем ресуспендировали в смеси 1:10 анти-pSTAT1 Alexa Fluor 647:FACS буфер (100 мкл) в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте, промывали два раза в FACS буфере и анализировали с использованием проточного цитометра LSRII (BD Biosciences).

Для определения ингибиторной активности испытываемого соединения среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) pSTAT1 измеряли в CD14+ моноцитах. IC₅₀ значения определяли из анализа кривых ингибирования, представляющих MFI против концентрации соединения. Данные выражены как pIC₅₀ (отрицательный десятичный логарифм IC₅₀) значения. В этом анализе соединение **1** показало pIC₅₀ значение около 7,1.

Анализ 7: Фармакокинетика в глазной ткани кролика

Целью этого анализа было определение фармакокинетики испытываемого соединения в глазных тканях кролика.

Композиция раствора

1-(2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-4-фтор-1H-индазол-3-ил)-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-c]пиридин-5-ил)-2-морфолиноэтан-1-он (**1**), полученный в Примере 2, растворяли в 2% 2-гидроксипропил- β -циклодекстрине до достижения целевой концентрации 1 мг/мл. Билатеральную интравитреальную инъекцию (50 мкл/глаз) раствора испытываемого соединения вводили новозеландским белым кроликам (50 мкг/глаз). Концентрацию испытываемого соединения измеряли в глазных тканях: стекловидном теле, внутриглазной жидкости, сетчатке/сосудистой оболочке и иридоцилиарной зоне в заранее определенных точках времени после инъекции (30 минут, 4 ч, 1 д, 3 д, 7 д, 14 д). Введение осуществляли двум кроликам (четыре глаза) для каждой временной точки. В ткани стекловидного тела соединение **1** показало двухфазное снижение концентрации, характеризующееся начальным снижением концентрации с периодом полужизни примерно 9 часов и в завершение с конечным периодом полужизни примерно 2 дня. Было обнаружено, что соединение также быстро распределяется в сетчатке и в сосудистой оболочке и показывает такой же фармакокинетический профиль, как в ткани стекловидного тела.

Композиция суспензии

Композицию суспензии получали путем объединения соединения **1** Примера 2 (Форма 1) с 0,5% гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMC E5) + 0,02% Tween 80 в физиологическом растворе до достижения целевой концентрации 5 мг/мл, 20 мг/мл и 80 мг/мл для доз 0,25 мг/глаз, 1 мг/глаз и 4 мг/глаз, соответственно. Билатеральную интравитреальную инъекцию (50 мкл/глаз) суспензии испытываемого соединения вводили новозеландским белым кроликам. Концентрацию испытываемого соединения измеряли в глазных тканях, как в анализе композиции раствора, через 30 минут, 4 ч, 24 ч, 72 ч, 7 д, 14 д, 28 д, 56 д и 84 д после инъекции. Для группы введения дозы 4 мг/глаз также собирали данные в дополнительной временной точке через 168 дней. Все дозовые группы показали измеряемую концентрацию лекарственного средства в глазу вплоть до последней временной точки, анализируемой в этом исследовании. Устойчивую продолжительную экспозицию наблюдали для всех доз через 12 недель (84 дня). Продолжительную экспозицию наблюдали через 24 недели (84 дня) для дозовой группы 4 мг/глаз. Соединение показало линейное снижение концентрации лекарственного средства в ткани стекловидного тела от 30 минут до 24 недель при скорости выведения лекарственного средства примерно 5–10 мкг/мл/день. Скорость выведения соответствует растворимости соединения **1** в носителе и фармакокинетику в глазных тканях при использовании композиции раствора. Все дозовые группы показали измеряемую концентрацию лекарственного средства в глазу вплоть до последней временной точки, анализируемой в этом исследовании. Поэтому вполне вероятно, что экспозиция лекарственного средства является более продолжительной, чем наблюдаемая в этом исследовании. Измеряли концентрацию лекарственного средства в плазме и было найдено, что она по меньшей мере на 3 порядка величины ниже, чем концентрация в ткани стекловидного тела, при всех трех концентрациях.

Композицию суспензии получали путем объединения соединения **1** Примера 5 (Форма 2) с 0,5% гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMC E5) + 0,02% Tween 80 в физиологическом растворе до достижения целевой концентрации 0,4 мг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл и 20 мг/мл для доз 0,02 мг/глаз, 0,05 мг/глаз, 0,1 мг/глаз и 1 мг/глаз, соответственно. Билатеральную интравитреальную инъекцию (50 мкл/глаз) суспензии испытываемого соединения вводили голландским кроликам. Концентрацию испытываемого соединения измеряли в жидкой части стекловидного тела, внутриглазной жидкости, иридо–цилиарной зоне, сетчатке, клетках пигментного эпителия сетчатки/хороиальных клетках и плазме через 30 мин, 7д, 14д, 28д, 42д и 56д после инъекции. Соединение показало очень постепенное снижение концентрации лекарственного средства в ткани стекловидного тела от 30 минут до последней анализируемой временной точки (28д для дозы 0,02 мг/глаз, 42д для дозы 0,05 мг/глаз и доз 1 мг/глаз и 56д для дозы 0,1 мг/глаз). Все дозовые группы показали измеряемую концентрацию лекарственного средства в глазу вплоть до последней временной точки, анализируемой в этом исследовании. Поэтому вполне вероятно, что экспозиция лекарственного средства является более продолжительной, чем

наблюдаемая в этом исследовании. Измеряли концентрацию лекарственного средства в плазме, и было найдено, что она по меньшей мере на 3 порядка величины ниже, чем концентрация в ткани стекловидного тела, при всех трех концентрациях. 3 порядка величины соответствуют логарифмической шкале (т.е. 1000 по нелогарифмической шкале).

Анализ 8: Фармакодинамический анализ: Ингибирование IL-6–индуцированного pSTAT3 у крыс

Способность испытываемого соединения при разовом интравитреальном введении ингибировать IL-6–индуцированный pSTAT3 измеряли в гомогенатах сетчатки/сосудистой оболочки крыс.

Композицию суспензии получали путем объединения соединения **1** Примера 2 с 0,5% гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMC E5 LV), 0,02% Tween 80 и 9 мг/мл хлорида натрия в очищенной воде до достижения целевой концентрации 10 мг/мл.

Самкам крыс Lewis интравитреально (и/в) вводили (5 мкл/глаз) композицию суспензии. Через три дня интравитреально вводили IL-6 (Peprotech; 0,1 мг/мл; 5 мкл/глаз) или носитель для индукции pSTAT3. Глазные ткани иссекали через один час после второй и/в инъекции IL-6. Ткани сетчатки/сосудистой оболочки гомогенизировали и уровни pSTAT3 измеряли с использованием ELISA (Cell Signaling Technology). Процент ингибирования IL-6–индуцированного pSTAT3 рассчитывали по сравнению с группами носитель/носитель и носитель/IL-6. Ингибирование больше чем 100% отражает снижение уровней pSTAT3 до ниже тех, которые наблюдали в группе носитель/носитель.

При предварительном лечении за 3 дня до IL-6–стимуляции доза 50 мкг соединения **1**, вводимая с использованием композиции суспензии, ингибировала IL-6–индуцированный pSTAT3 на 116% в ткани сетчатки/сосудистой оболочки.

Анализ 9: Фармакодинамический анализ: Ингибирование IFN γ –индуцированного IP-10 в глазах кролика

Способность испытываемого соединения при разовом интравитреальном введении ингибировать интерферон–гамма (IFN γ)–индуцированные уровни IP-10 белка измеряли в стекловидном теле и тканях сетчатки/сосудистой оболочки кролика.

Композицию суспензии получали путем объединения соединения **1** Примера 2 (Форма 1) с 0,5% гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMC E5), 0,02% Tween 80 и 9 мг/мл хлорида натрия в очищенной воде до достижения целевой концентрации 20 мг/мл.

Для исследований использовали самцов новозеландских белых кроликов (Liveon Biolabs, India). Животным давали акклиматизироваться после их доставки в лабораторию для проведения исследований (Liveon Biolabs, India). Каждому кролику делали две интравитреальные (и/в) инъекции с общим объемом дозы 50 мкл/глаз. Первая и/в инъекция (45 мкл/глаз) обеспечила доставку 0,9 мг испытываемого соединения или носителя. Спустя одну неделю вторая и/в инъекция (5 мкл/глаз) обеспечила доставку IFN γ (1 мкг/глаз; исходный раствор 1 мг/мл; Kingfisher Biotech) или носителя для индукции IP-10. В день введения инъекций кроликов анестезировали внутримышечной инъекцией

кетамин (35 мг/кг) и ксилазин (5 мг/кг). При достижении глубокой анестезии каждый глаз промывали стерильным физиологическим раствором и вводили и/в инъекции с использованием 0,5 мл инсулинового шприца (50 единиц=0,5 мл) с иглой 31 калибра на надназальной стороне обоих глаз, отмечая положение при помощи фиксированного штангенциркуля Браунштейна (2 3/4") на расстоянии 3,5 мм от прямой мышцы и 4 мм от лимба.

Ткани собирали через 24 часа после второй и/в инъекции IFN γ . Ткани стекловидного тела (VH) и ткани сетчатки/сосудистой оболочки (R/C) собирали и гомогенизировали, и уровни белка IP-10 измеряли с использованием набора CXCL10 (IP-10) ELISA для кролика (Kingfisher Biotech). Процент ингибирования IFN γ -индуцированного IP-10 рассчитывали по сравнению с группами носитель/носитель и носитель/IFN γ .

При предварительном лечении за 1 неделю до IFN γ -стимуляции суспензионная композиция соединения **1** ингибировала IFN γ -индуцированный IP-10 на 81% и 80% в стекловидном теле и тканях сетчатки/сосудистой оболочки, соответственно. Аналогичную эффективность также наблюдали при предварительном лечении за 1 месяц до IFN γ -стимуляции.

Анализ 10: Фармакокинетика в тканях кожи мышей и мини-свинок

Целью этого анализа было определения фармакокинетики испытываемого соединения в эпидермисе, дерме и плазме после 24-часового воздействия на кожу интактной мыши или мини-свинки.

1-(2-(6-(2-Этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-4-фтор-1H-индазол-3-ил)-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-c]пиридин-5-ил)-2-морфолиноэтан-1-он (1) формулировали в виде 0,5% (масс/масс) крема или мази, как описано, в виде Композиции А или Композиции В, соответственно, показанных в Таблице 6.

У 25 г самцов мышей Balb/c за двадцать четыре часа до введения инъекции сбрасывали волосы со спины, обнажая площадь по меньшей мере 6 см² (около 10% поверхности тела) и, в отдельном эксперименте, у 10 кг мини-свинок Gottingen обнажали площадь по меньшей мере 450 см² (около 10% поверхности тела). Во время 0, после анестезии изофлураном, испытываемое соединение наносили на спину мышей или мини-свинок в дозе 25 мкл/см². Кожу покрывали адгезивным покрытием, чтобы предотвратить потерю соединения, когда животное находилось в клетке или на подстилке.

После 24-часового воздействия спины осторожно промывали мылом и водой для удаления неабсорбированного лекарственного средства и высушивали. Сразу же после этой промывки брали кровь путем сердечной пункции у мышей и венепункции у мини-свинок. Наружный слой (роговой слой) затем удаляли с использованием липкой ленты. После воздействия на эпидермис делали 0,5 см пункционную биопсию. Эпидермис и дерму быстро разделяли, взвешивали и быстро замораживали. Подобные образцы были получены через 48 ч после введения дозы у мышей и через 48 ч, 94 ч и 168 ч (7 дней) после введения дозы у мини-свинок.

Образцы эпидермиса и дермы гомогенизировали в воде 1:10 (масс/об) с использованием ультразвукового гомогенизатора Covaris. Образцы экстрагировали в 3 объемах ацетонитрила и осуществляли количественные определения на основании стандартной кривой с использованием ЖХ–МС анализа. Как свидетельствуют фармакокинетические параметры AUC_{0-t} для плазмы, эпидермиса и дермы, показанные в приведенной ниже Таблице 7, значительная экспозиция соединения была в слоях эпидермиса и дермы, в то время как экспозиция в плазме была незначительной у мышей при использовании Композиции А и ниже предела количественного определения у мышей при использовании Композиции В и при использовании обеих Композиций у мини–свинок.

Таблица 6

Композиция А		Композиция В	
Соединение 1	0,5%	Соединение 1	0,5%
Стеариновая кислота	5%	Октилгидроксистеарат	5%
Цетостеаиловый спирт	5%	С8–С10 Триглицерид	5%
Изопропилпальмитат	4%	Вазелин (вазелиновое масло)	79,5%
Октилгидроксистеарат	2%	N–Метилпирролидон	10%
BRIJ S2 (ПЭГ 2 стеаиловый эфир)	1,08%		
BRIJ S20 (ПЭГ 20 стеаиловый эфир)	6,92%		
N–Метилпирролидин	10%		
ПЭГ 400	10%		
Вода, очищенная при помощи обратного осмоса	55,5%		

Таблица 7

	Плазма AUC_{0-t} (мкг*ч/мл)	Эпидермис AUC_{0-t} (мкг*ч/г)	Дерма AUC_{0-t} (мкг*ч/г)
Мышь Композиция А	0,022	1370	99
Мышь Композиция В	<0,001	10700	1110
Мини–свинка Композиция А	<0,001	1220	44
Мини–свинка	<0,001	2460	88

Композиция В			
--------------	--	--	--

Анализ 11: Фармакокинетика в легких и плазме у мышей

Концентрации соединения **1** в плазме и легких и их соотношения определяли следующим образом. В анализе использовали мышей BALB/c от Charles River Laboratories. Соединение **1** Формы 1 примера 2 формулировали в виде суспензии в 0,01% Tween 80 в физиологическом растворе (0,9% хлорида натрия в воде) в концентрации 0,1 мг/мл. 50 мкл суспензионного препарата вводили в трахею мыши путем оральной аспирации. В различных временных точках (0,083, 1, 4, 24, 48, 72 и 96 час.). После введения дозы брали образцы крови путем сердечной пункции и у мышей вырезали интактные легкие. Образцы крови центрифугировали (центрифуга Эппендорфа, 5804R) в течение 4 минут при приблизительно 12000 об/мин при 4°C для сбора плазмы. Легкие сушили, промакивая тампоном, взвешивали и гомогенизировали при разведении 1:3 в стерильной воде. Концентрации соединения **1** в плазме и легких определяли анализом ЖХ–МС против аналитических стандартов, построенных в виде стандартной кривой в тестируемой матрице. Хорошая экспозиция в легких была обнаружена при AUC (0–96 ч) 360 мкг*ч/г. Период полужизни в легких был рассчитан как составляющий примерно 40 часов. Отношение легкие:плазма определяли как отношение AUC в мкг*ч/г в легких к AUC мкг*ч/мл в плазме (где AUC обычно определяют как площадь под кривой концентрации испытываемого соединения в зависимости от времени). Отношение AUC значений легкие:плазма составило 1780, что указывает на очень низкую экспозицию в плазме.

Анализ 12: Фармакодинамический Анализ: Ингибирование IFN γ –индуцированного pSTAT1 в глазах кролика

Способность испытываемого соединения при разовом интравитреальном введении ингибировать интерферон–гамма (IFN γ)–индуцированное фосфорилирование STAT1 белка (pSTAT1) измеряли в ткани сетчатки/сосудистой оболочки кролика.

Композицию суспензии получали путем объединения соединения **1** Примера 2 (Форма 1) с 0,5% гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMC E5), 0,02% Tween 80 и 9 мг/мл хлорида натрия в очищенной воде до достижения целевой концентрации 20 мг/мл.

Для исследований использовали самцов новозеландских белых кроликов (Liveon Biolabs, India). Животным давали акклиматизироваться после их доставки в лабораторию для проведения исследований (Liveon Biolabs, India). Каждому кролику делали две интравитреальные (и/в) инъекции с общим объемом дозы 50 мкл/глаз. Первая и/в инъекция (45 мкл/глаз) обеспечила доставку 0,9 мг испытываемого соединения или носителя. Спустя одну неделю вторая и/в инъекция (5 мкл/глаз) обеспечила доставку IFN γ (1 мкг/глаз; исходный раствор 1 мг/мл; Kingfisher Biotech) или носителя для индукции IP–10. В день введения инъекций кроликов анестезировали внутримышечной инъекцией кетамина (35 мг/кг) и ксилазина (5 мг/кг). При достижении глубокой анестезии каждый глаз промывали стерильным физиологическим раствором и вводили и/в инъекции с использованием 0,5 мл инсулинового шприца (50 единиц=0,5 мл) с иглой 31 калибра на

надназальной стороне обоих глаз, отмечая положение при помощи фиксированного штангенциркуля Браунштейна (2 3/4") на расстоянии 3,5 мм от прямой мышцы и 4 мм от лимба.

Ткани собирали через 2 часа после второй и/в инъекции IFN γ . Ткани сетчатки/сосудистой оболочки (R/C) собирали и гомогенизировали, и уровни белка pSTAT1 измеряли с использованием количественного вестерн-блот анализа на устройстве ProteinSimple WES. Процент ингибирования IFN γ -индуцированного pSTAT1 рассчитывали по сравнению с группами носитель/носитель и носитель/IFN γ .

При предварительном лечении за 1 неделю до IFN γ -стимуляции суспензионная композиция соединения **1** ингибировала IFN γ -индуцированный pSTAT1 на 85%. После предварительного введения разовой дозы суспензионной композиции за 3 месяца до IFN γ -стимуляции суспензионная композиция соединения **1** ингибировала IFN γ -индуцированный pSTAT1 на 76%.

Композицию суспензии получали путем объединения соединения **1** Примера 5 (Форма 2), с 0,5% гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMC E5) + 0,02% Tween 80 в физиологическом растворе до достижения целевой концентрации 11,1, 3,3 и 1,1 мг/мл.

Для исследований использовали самцов новозеландских белых кроликов (Liveon Biolabs, India). Животным давали акклиматизироваться после их доставки в лабораторию для проведения исследований (Jubilant Biosys Ltd., India). Каждому кролику делали две интравитреальные (и/в) инъекции с общим объемом дозы 50 мкл/глаз. Первая и/в инъекция (45 мкл/глаз) обеспечила доставку 500 мкг, 150 мкг или 50 мкг испытываемого соединения или носителя. Спустя две недели вторая и/в инъекция (5 мкл/глаз) обеспечила доставку IFN γ (1 мкг/глаз; исходный раствор 1 мг/мл; Kingfisher Biotech) или носителя для индукции IP-10. В день введения инъекций кроликов анестезировали внутримышечной инъекцией кетамина (35 мг/кг) и ксилазина (5 мг/кг). При достижении глубокой анестезии каждый глаз промывали стерильным физиологическим раствором и вводили и/в инъекции с использованием 0,5 мл инсулинового шприца (50 единиц=0,5 мл) с иглой 31 калибра на надназальной стороне обоих глаз, отмечая положение при помощи фиксированного штангенциркуля Браунштейна (2 3/4") на расстоянии 3,5 мм от прямой мышцы и 4 мм от лимба.

Ткани собирали через 2 часа после второй и/в инъекции IFN γ . Ткани сетчатки/сосудистой оболочки (R/C) собирали и гомогенизировали, и уровни белка pSTAT1 измеряли с использованием количественного вестерн-блот анализа на устройстве ProteinSimple WES. Процент ингибирования IFN γ -индуцированного pSTAT1 рассчитывали по сравнению с группами носитель/носитель и носитель/IFN γ .

При предварительном лечении за 2 недели до IFN γ -стимуляции суспензионная композиция соединения **1** ингибировала IFN γ -индуцированный pSTAT1 на 79% для дозы 500 мкг, на 58% для дозы 150 мкг и на 61% для дозы 50 мкг.

Анализ 13: Скринирование кинома и коэффициент GINI

Соединения **1** и **C-1** скринировали против других киназ для оценки их профиля

селективности.

Меченные киназой штаммы фага T7 выращивали параллельно в 24-луночных блоках в хозяине *E. coli*, полученном из штамма BL21. *E. coli* выращивали до лог-фазы и инфицировали T7 фагом из замороженного штамма (множественность заражения=0,4) и инкубировали при встряхивании при 32°C до лизиса (90–150 минут). Лизаты центрифугировали (6000 × g) и фильтровали (0,2 мкм) для удаления клеточного дебриса. Остальные киназы были продуцированы в клетках HEK–293 и затем помечены ДНК для кПЦР детекции.

Покрытые стрептавидином магнитные шарики обрабатывали биотинилированными низкомолекулярными лигандами в течение 30 минут при комнатной температуре для получения аффинных смол для киназных анализов. Лиганд-связанные шарики блокировали избытком биотина и промывали блокирующим буфером (SeaBlock (Pierce), 1% BSA, 0,05% Tween 20, 1 mM DTT) для удаления несвязанного лиганда и уменьшения неспецифического связывания с фагом. Реакции связывания объединяли путем объединения киназ, лиган-связанных аффинных шариков и испытываемых соединений в 1x связывающем буфере (20% SeaBlock, 0,17x PBS, 0,05% Tween 20, 6 mM DTT). Испытываемые соединения подготавливали в виде 40x исходных растворов в 100% DMSO и непосредственно разбавляли в анализе. Все реакции осуществляли в полипропиленовых 384-луночных планшетах в конечном объеме 0,04 мл. Аналитические планшеты инкубировали при комнатной температуре при встряхивании в течение 1 часа и аффинные шарики промывали промывочным буфером (1x PBS, 0,05% Tween 20). Затем шарики ресуспендировали в элюирующем буфере (1x PBS, 0,05% Tween 20, 0,5 мкМ небитинилированного аффинного лиганда) и инкубировали при комнатной температуре при встряхивании в течение 30 минут. Концентрация киназы в элюатах измеряли количественной ПЦР.

Соединения скринировали при 1 мкМ, и результаты связывающих взаимодействий для первичного скрининга в Таблицах 8 и 9 представлены как “% ингибирования” ($=100 - ((\text{сигнал испытываемого соединения} - \text{сигнал положительного контроля}) / ((\text{сигнал отрицательного контроля}) - (\text{сигнал положительного контроля}))) \times 100$), где отрицательный контроль представляет собой DMSO, а положительный контроль представляет собой контрольное соединение.

Таблица 8

Соединение/Киназа	AURK		CDK2	CDK7	CDK9	CSF1		GSK3B
	ALK	A				R	EPHB6	
1	75	11	6	74	9	98	88	31
C-1	81	57	53	99	95	100	98	68

Таблица 9

Соединение/Киназа	KIT	PAK	PKAC	PLK4	SL	SR	SYK	VEGFR2
-------------------	-----	-----	------	------	----	----	-----	--------

		4	– АЛЬФ А		К	С		
1	87	93	20	58	100	93	46	42
С–1	99	99	70	68	100	100	78	63

Было обнаружено, что соединение **1** показывает значительно более низкое ингибирование связывания для CDK7 и CDK9, чем соединение **С–1**. Соединение **1** также имело более низкое ингибирование связывания для некоторых других киназ.

Оба соединения **1** и **С–1** скрининговали против 35 различных киназ. Коэффициент GINI был определен для обоих соединений. Соединение **1** имело коэффициент GINI 0,62, а соединение **С–1** имело коэффициент GINI 0,46. Коэффициент GINI используется для выражения селективности соединения по отношению к панели киназ (Graczyk, J. Med. Chem., 2007, 50, 5773–5779). Более высокое значение соответствует более селективному соединению.

Единственное структурное различие между соединением **1** и соединением **С–1** заключается в наличии фтор группы в ядре. Было показано, что это структурное различие существенно влияет на селективность соединения в отношении киназы.

Анализ 14: Анализ цитотоксичности

CellTiter–Glo люминесцентный анализ клеточной жизнеспособности/цитотоксичности осуществляли в эпителиальных клетках легкого человека BEAS–2B (ATCC) в нормальных условиях роста.

Клетки выращивали при 37°C в 5% CO₂ увлажненном инкубаторе в 50% DMEM/50% F–12 среде (Life Technologies), дополненной 10% FBS (Hyclone), 100 Ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Life Technologies) и 2 мМ GlutaMAX (Life Technologies). В день 1 анализа клетки высевали при плотности 500 клеток/лунка в белые 384–луночные планшеты для тканевых культур (Corning) с 25 мкл среды и оставляли для адгезии в течение ночи в инкубаторе. В день 2 анализа добавляли 5 мкл среды, содержащей доза–ответы испытываемых соединений, и инкубировали при 37°C в течение 48 часов. Затем добавляли 30 мкл раствора для детекции CellTiter–Glo (Promega), смешивали на орбитальном шейкере в течение 5 минут и инкубировали еще в течение 10 минут, затем считывали на планшет–ридере EnVision. Регистрировали сигналы люминесценции и рассчитывали контрольные значения процента DMSO.

Для анализа доза–ответ контрольные данные процента DMSO наносили на график против концентраций соединения для получения кривых доза–ответ, проводя линию, соединяющую каждую точку данных. Концентрацию, при которой каждая кривая пересекает порог 15% ингибирования, определяют как CC₁₅.

Как ожидают, испытываемые соединения, демонстрирующие более высокое CC₁₅ значение в этом анализе, менее вероятно могут вызывать цитотоксичность.

Соединение **1** показало CC₁₅ значение, равное 3,16 мкМ, тогда как соединение **С–1**

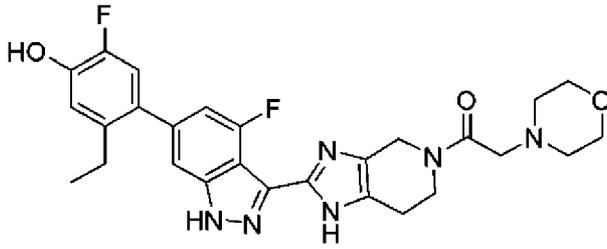
показало CC_{15} значение, равное 630нМ. Поэтому, на основании этого анализа, соединение **1** с значительно меньшей вероятностью будет вызывать цитотоксичность, чем соединение **C-1**.

Единственным структурным различием между соединением **1** и соединением **C-1** является присутствие фтор группы в ядре. Это структурное различие, как было показано, существенно влияет на цитотоксичность соединения.

Хотя настоящее изобретение было описано со ссылкой на конкретные аспекты или варианты его осуществления, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что возможны различные изменения, или можно использовать заменяющие эквиваленты без отклонения от сущности и объема изобретения. Кроме того, в той степени, в которой это допускается применимыми патентными законами и положениями, все публикации, патенты и патентные заявки, процитированные в настоящей заявке, включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей их полноте в той же степени, как если бы каждый документ был отдельно включен в настоящую заявку посредством ссылки.

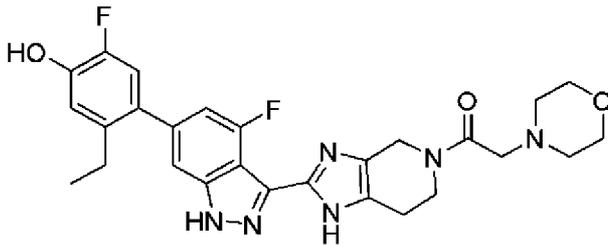
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы:

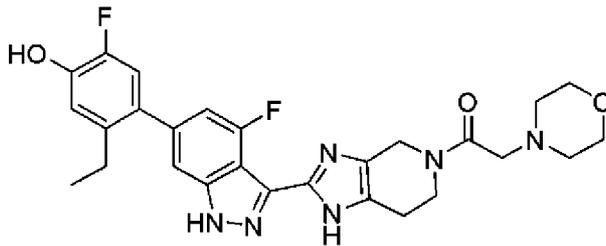


или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение формулы:



3. Кристаллическая форма соединения формулы:



где кристаллическая форма характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, содержащей дифракционные пики при значениях 2θ $10,61\pm 0,20$, $11,84\pm 0,20$, $14,94\pm 0,20$, $18,26\pm 0,20$ и $19,06\pm 0,20$.

4. Кристаллическая форма по п. 3, где рентгеновская порошковая дифрактограмма дополнительно характеризуется тем, что имеет дополнительные дифракционные пики при значениях 2θ $13,32\pm 0,20$, $17,69\pm 0,20$ и $21,10\pm 0,20$.

5. Кристаллическая форма по п. 4, где рентгеновская порошковая дифрактограмма дополнительно характеризуется тем, что имеет два или более дополнительных дифракционных пиков при значениях 2θ , выбранных из $10,85\pm 0,20$, $16,14\pm 0,20$, $16,35\pm 0,20$, $18,43\pm 0,20$, $19,20\pm 0,20$, $19,49\pm 0,20$, $20,72\pm 0,20$, $21,94\pm 0,20$, $22,64\pm 0,20$, $23,64\pm 0,20$, $25,19\pm 0,20$ и $28,08\pm 0,20$.

6. Кристаллическая форма по п. 3, где кристаллическая форма характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, на которой положения пиков по существу соответствуют положениям пиков на дифрактограмме, показанной на Фиг. 1.

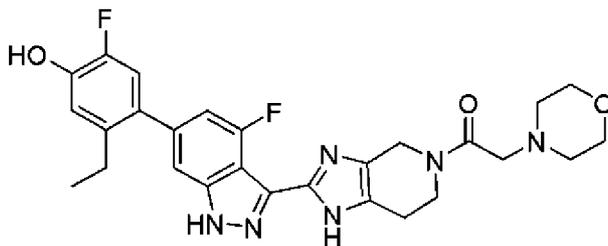
7. Кристаллическая форма по п. 3, где кристаллическая форма характеризуется кривой дифференциальной сканирующей калориметрии, полученной при скорости

нагрева 10°C в минуту, которая представляет максимум в эндотермическом тепловом потоке при температуре между 268°C и 277°C .

8. Кристаллическая форма по п. 3, где кристаллическая форма характеризуется кривой дифференциальной сканирующей калориметрии, полученной при скорости нагрева 10°C в минуту, которая представляет максимум в эндотермическом тепловом потоке с пиком при $272,6\pm 2^{\circ}\text{C}$.

9. Кристаллическая форма по п. 3, где кристаллическая форма характеризуется кривой дифференциальной сканирующей калориметрии по существу в соответствии с кривой, показанной на Фиг. 2.

10. Кристаллическая форма соединения формулы:



где кристаллическая форма характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, содержащей дифракционные пики при значениях 2θ $8,16\pm 0,20$, $8,97\pm 0,20$, $15,29\pm 0,20$, $16,70\pm 0,20$, $18,00\pm 0,20$ и $20,18\pm 0,20$.

11. Кристаллическая форма по п. 10, где рентгеновская порошковая дифрактограмма дополнительно характеризуется тем, что имеет два или более дополнительных дифракционных пиков при значениях 2θ , выбранных из $7,69\pm 0,20$, $10,66\pm 0,20$, $11,46\pm 0,20$, $11,91\pm 0,20$, $15,80\pm 0,20$, $17,02\pm 0,20$, $18,83\pm 0,20$, $22,39\pm 0,20$, $22,98\pm 0,20$, $24,89\pm 0,20$ и $26,54\pm 0,20$.

12. Кристаллическая форма по п. 10, где кристаллическая форма характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, на которой положения пиков по существу соответствуют положениям пиков на дифрактограмме, показанной на Фиг. 6.

13. Кристаллическая форма по п. 10, где кристаллическая форма характеризуется кривой дифференциальной сканирующей калориметрии, полученной при скорости нагрева 10°C в минуту, которая представляет максимум в эндотермическом тепловом потоке при температуре между 215°C и 229°C .

14. Кристаллическая форма по п. 10, где кристаллическая форма характеризуется кривой дифференциальной сканирующей калориметрии, полученной при скорости нагрева 10°C в минуту, которая представляет максимум в эндотермическом тепловом потоке с пиком при $221,7\pm 3^{\circ}\text{C}$.

15. Кристаллическая форма по п. 10, где кристаллическая форма характеризуется кривой дифференциальной сканирующей калориметрии по существу в соответствии с кривой, показанной на Фиг. 7.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п. 1 или 2 или кристаллическую форму по любому из пп. 3–15 и фармацевтически приемлемый

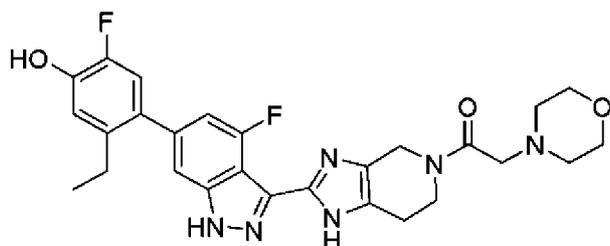
носитель.

17. Фармацевтическая композиция по п. 16, где композиция является подходящей для глазного применения.

18. Фармацевтическая композиция по п. 17, где композиция является подходящей для интравитреальной инъекции.

19. Фармацевтическая композиция по п. 18, где композиция представляет собой суспензию.

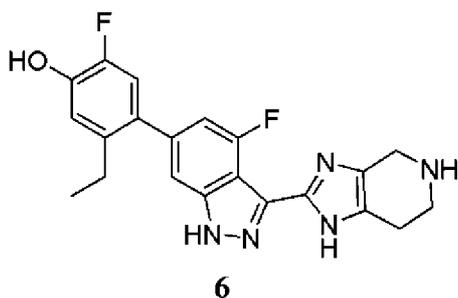
20. Способ получения соединения формулы **1**



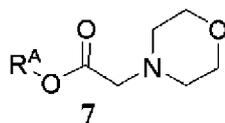
1

или его фармацевтически приемлемой соли, включающий:

(a) взаимодействие соединения формулы **6**:



с соединением формулы **7**:

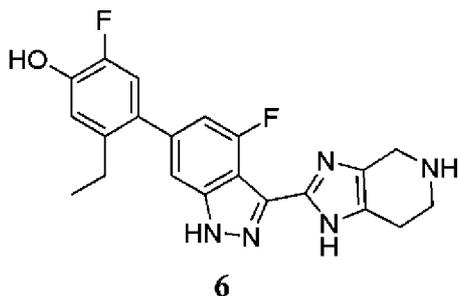


где R^A представляет собой водород или 2,5-диоксопирролидинил, и

(b) необязательно получение фармацевтически приемлемой соли,

с получением соединения формулы **1** или его фармацевтически приемлемой соли.

21. Соединение формулы **6**:



или его соль.

22. Способ получения кристаллической формы по п. 3, включающий:

(а) образование гомогенной смеси 1-(2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-4-фтор-1H-индазол-3-ил)-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)-2-морфолиноэтан-1-она в полярном апротонном растворителе, или в полярном смешивающемся с водой растворителе, или в смеси полярного апротонного растворителя и полярного смешивающегося с водой растворителя, при температуре между 45 и 75°C;

(b) добавление гомогенной смеси к смеси смешивающегося с водой растворителя и воды при температуре между 60 и 90°C с получением второй смеси;

(с) медленное добавление воды к второй смеси при температуре между 60 и 90°C с получением суспензии; и

(d) выделение кристаллической формы из суспензии.

23. Способ по п. 22, где полярный апротонный растворитель стадии (а) выбран из группы, состоящей из DMSO, DMF, NMP, DMAc и нитрометана, полярный смешивающийся с водой растворитель стадии (а) выбран из группы, состоящей из ацетонитрила, ацетона, метанола, этанола и THF, и смешивающийся с водой растворитель стадии (b) выбран из группы, состоящей из ацетонитрила, ацетона, метанола, этанола, n-пропанола, изопропанола, n-бутанола, THF, DMSO, DMF, NMP, DMAc и нитрометана.

24. Соединение по п. 1 или 2 или кристаллическая форма по любому из пп. 3–15 для применения в лечении глазного заболевания у млекопитающего.

25. Соединение или кристаллическая форма по п. 24, где глазное заболевание представляет собой увеит, диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, синдром сухого глаза, возрастную дегенерацию желтого пятна, окклюзию вены сетчатки или атопический кератоконъюнктивит.

26. Соединение или кристаллическая форма по п. 25, где глазное заболевание представляет собой диабетический макулярный отек или увеит.

27. Применение соединения по п. 1 или 2 или кристаллической формы по любому из пп. 3–15 для получения лекарственного средства для лечения глазного заболевания у млекопитающего.

28. Применение по п. 27, где глазное заболевание представляет собой увеит, диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, синдром сухого глаза, возрастную дегенерацию желтого пятна, окклюзию вены сетчатки или атопический кератоконъюнктивит.

29. Способ лечения глазного заболевания у млекопитающего, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей соединение по п. 1 или 2 или кристаллическую форму по любому из пп. 3–15 и фармацевтически приемлемый носитель, в глаз млекопитающего.

30. Способ по п. 29, где глазное заболевание представляет собой увеит, диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, синдром сухого глаза, возрастную дегенерацию желтого пятна, окклюзию вены сетчатки или атопический

кератоконъюнктивит.

31. Способ по п. 30, где глазное заболевание представляет собой увеит или диабетический макулярный отек.

32. Соединение по п. 1 или 2 или кристаллическая форма по любому из пп. 3–15 для применения в лечении воспалительного заболевания кожи у млекопитающего.

33. Соединение или кристаллическая форма по п. 32, где воспалительное заболевание кожи представляет собой атопический дерматит.

34. Применение соединения по п. 1 или 2 или кристаллической формы по любому из пп. 3–15 для получения лекарственного средства для применения в лечении воспалительного заболевания кожи у млекопитающего.

35. Применение по п. 34, где воспалительное заболевание кожи представляет собой атопический дерматит.

36. Способ лечения воспалительного заболевания кожи у млекопитающего, включающий нанесение фармацевтической композиции, содержащей соединение по п. 1 или 2 или кристаллическую форму по любому из пп. 3–15 и фармацевтически приемлемый носитель, на кожу млекопитающего.

37. Способ по п. 36, где воспалительное заболевание кожи представляет собой атопический дерматит.

38. Соединение по п. 1 или 2 или кристаллическая форма по любому из пп. 3–15 для применения в лечении респираторного заболевания у млекопитающего.

39. Соединение или кристаллическая форма по п. 38, где респираторное заболевание представляет собой астму, хроническую обструктивную болезнь легких, кистозный фиброз, пневмонит, идиопатический легочный фиброз, острое повреждение легких, острый респираторный дистресс–синдром, бронхит, эмфизему, отторжение трансплантата легкого, первичную дисфункцию трансплантата, организующуюся пневмонию, острое отторжение трансплантата легкого, лимфоцитарный бронхиолит, хроническую дисфункцию аллотрансплантата легкого, рестриктивную хроническую дисфункцию аллотрансплантата легкого, нейтрофильную дисфункцию аллотрансплантата или облитерирующий бронхиолит.

40. Соединение или кристаллическая форма по п. 39, где респираторное заболевание представляет собой астму, хроническую дисфункцию аллотрансплантата легкого или хроническую обструктивную болезнь легких.

41. Применение соединения по п. 1 или 2 или кристаллической формы по любому из пп. 3–15 для получения лекарственного средства для лечения респираторного заболевания у млекопитающего.

42. Применение по п. 41, где респираторное заболевание представляет собой астму, хроническую обструктивную болезнь легких, кистозный фиброз, пневмонит, идиопатический легочный фиброз, острое повреждение легких, острый респираторный дистресс–синдром, бронхит, эмфизему, отторжение трансплантата легкого, первичную дисфункцию трансплантата, организующуюся пневмонию, острое отторжение

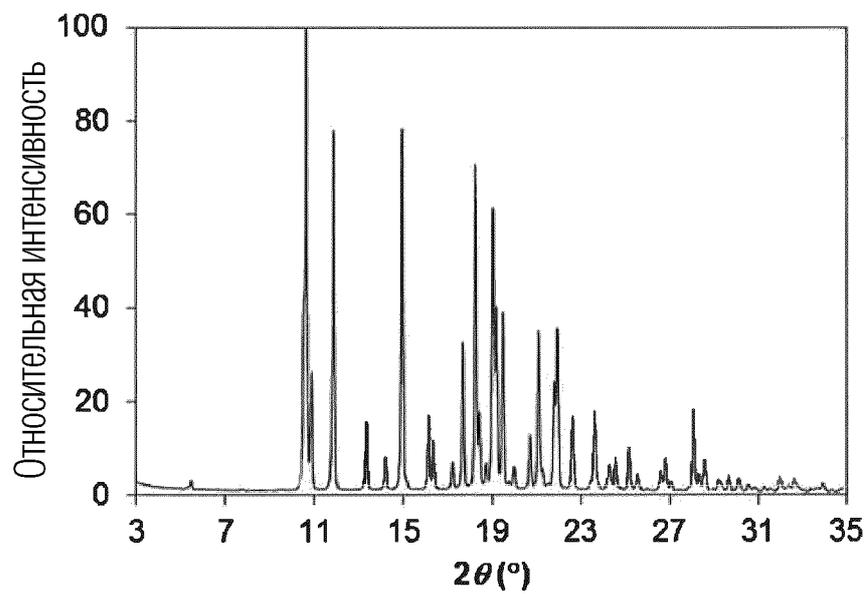
трансплантата легкого, лимфоцитарный бронхиолит, хроническую дисфункцию аллотрансплантата легкого, рестриктивную хроническую дисфункцию аллотрансплантата легкого, нейтрофильную дисфункцию аллотрансплантата или облитерирующий бронхиолит.

43. Способ лечения респираторного заболевания у млекопитающего, включающий введение млекопитающему фармацевтической композиции, содержащей соединение по п. 1 или 2 или кристаллическую форму по любому из пп. 3–15 и фармацевтически приемлемый носитель.

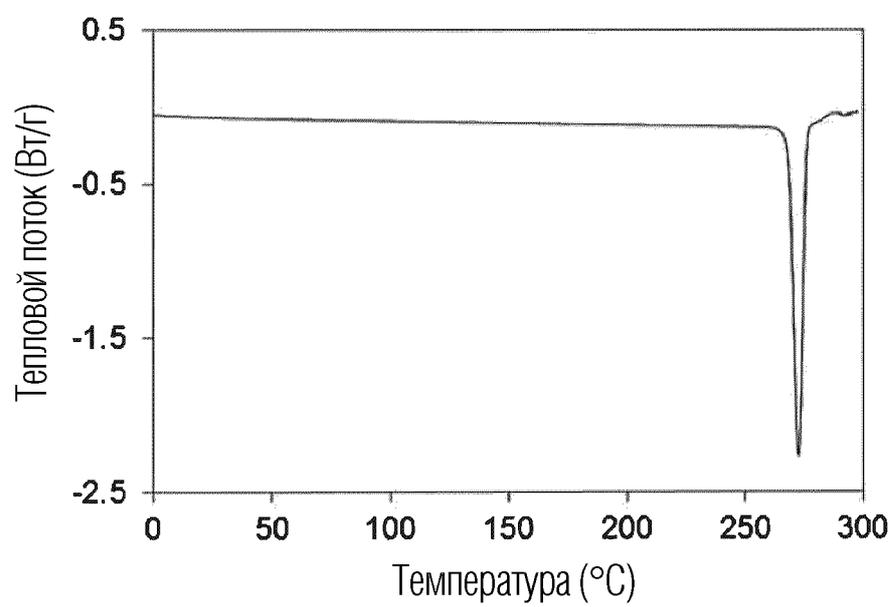
44. Способ по п. 43, где респираторное заболевание представляет собой астму, хроническую обструктивную болезнь легких, кистозный фиброз, пневмонит, идиопатический легочный фиброз, острое повреждение легких, острый респираторный дистресс-синдром, бронхит, эмфизему, отторжение трансплантата легкого, первичную дисфункцию трансплантата, организующуюся пневмонию, острое отторжение трансплантата легкого, лимфоцитарный бронхиолит, хроническую дисфункцию аллотрансплантата легкого, рестриктивную хроническую дисфункцию аллотрансплантата легкого, нейтрофильную дисфункцию аллотрансплантата или облитерирующий бронхиолит.

45. Способ по п. 44, где респираторное заболевание представляет собой астму, хроническую дисфункцию аллотрансплантата легкого или хроническую обструктивную болезнь легких.

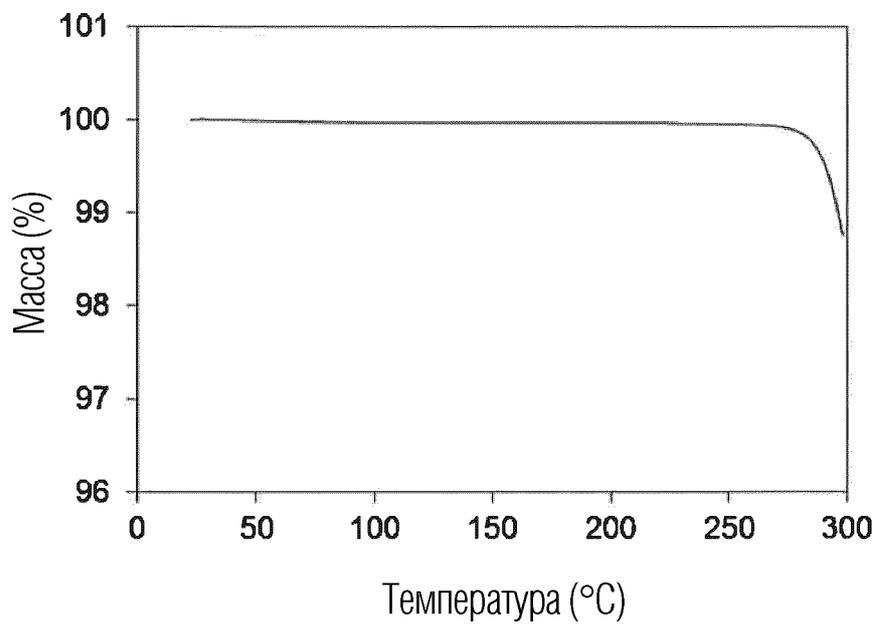
1/6



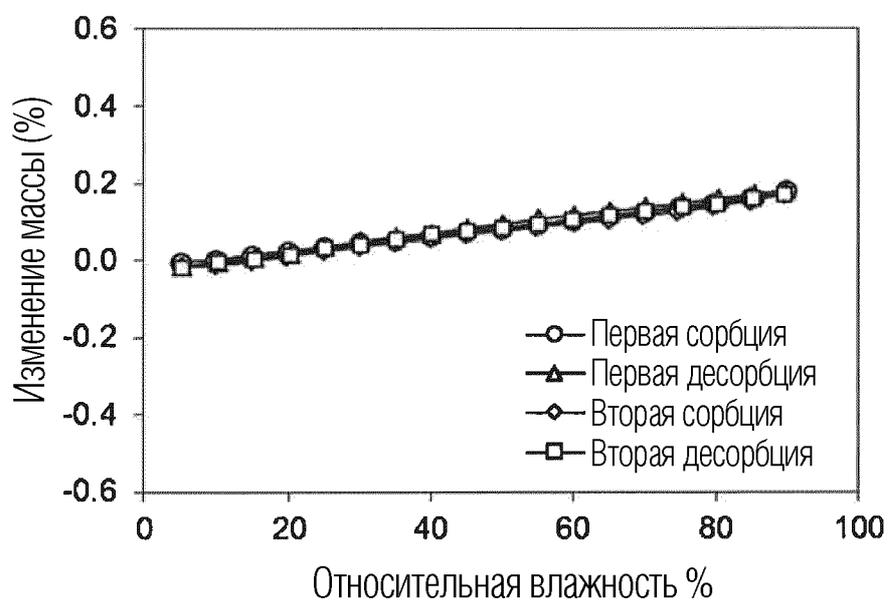
ФИГ. 1



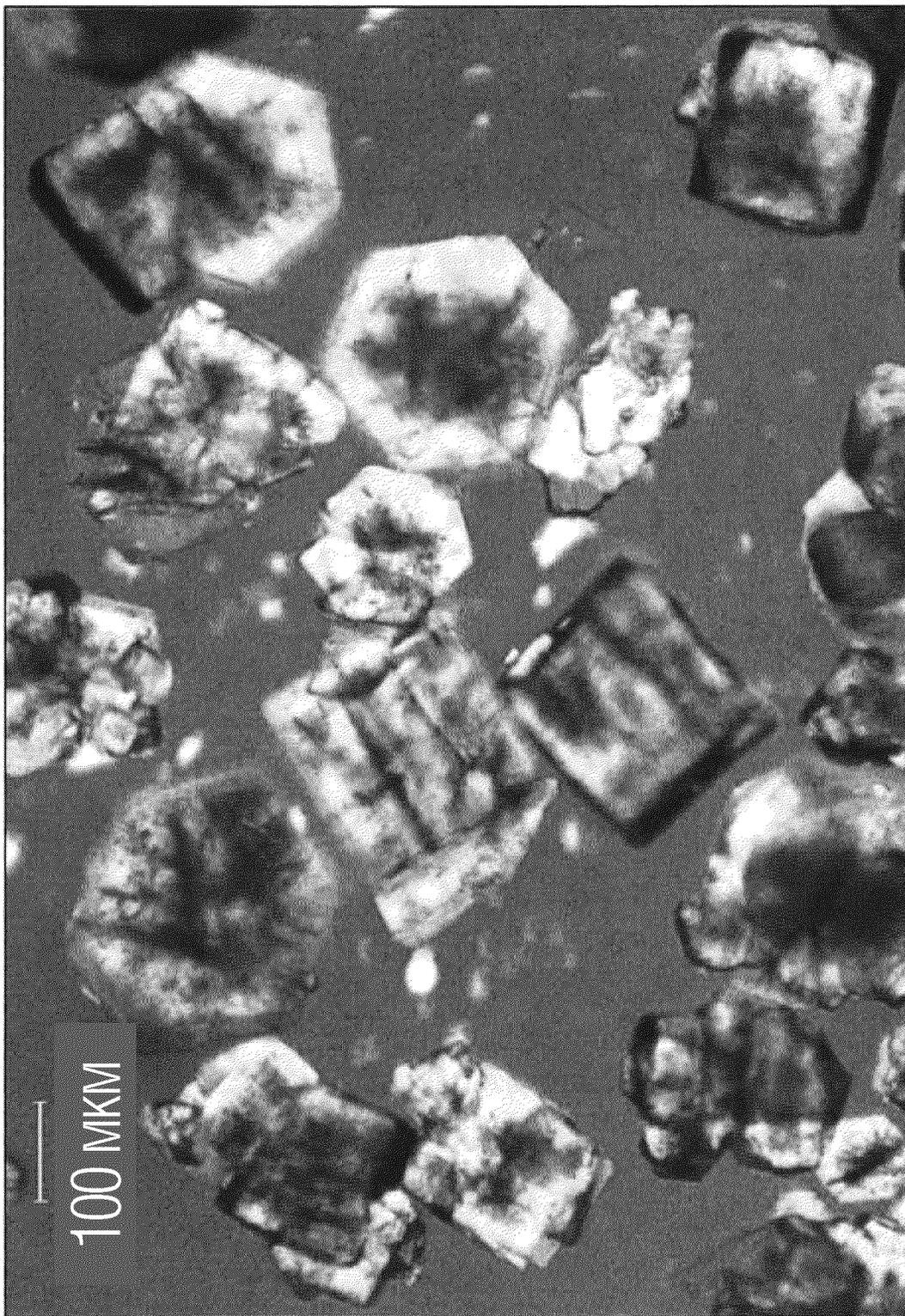
ФИГ. 2



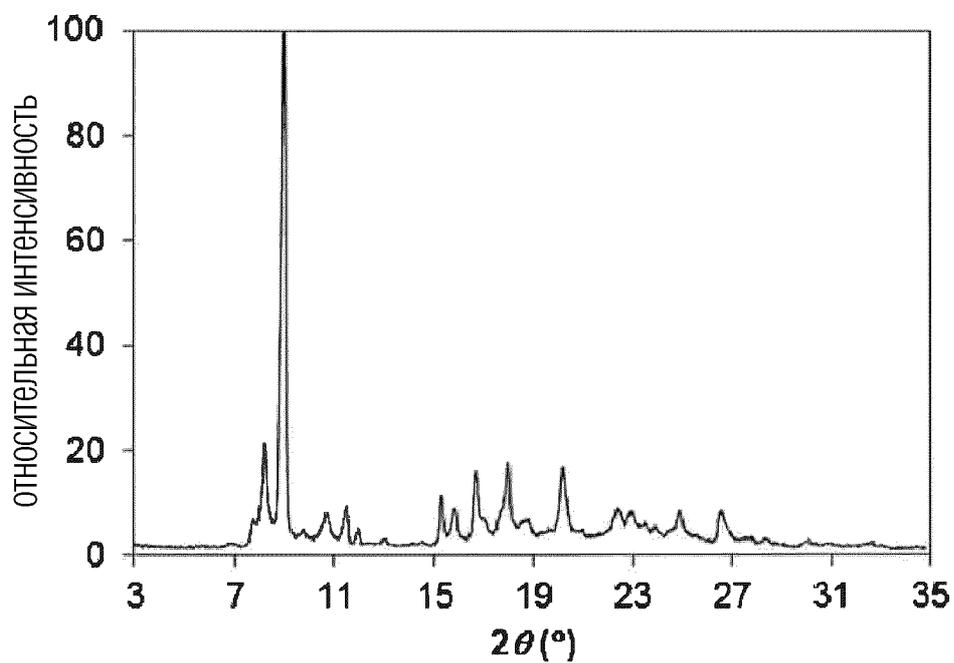
ФИГ. 3



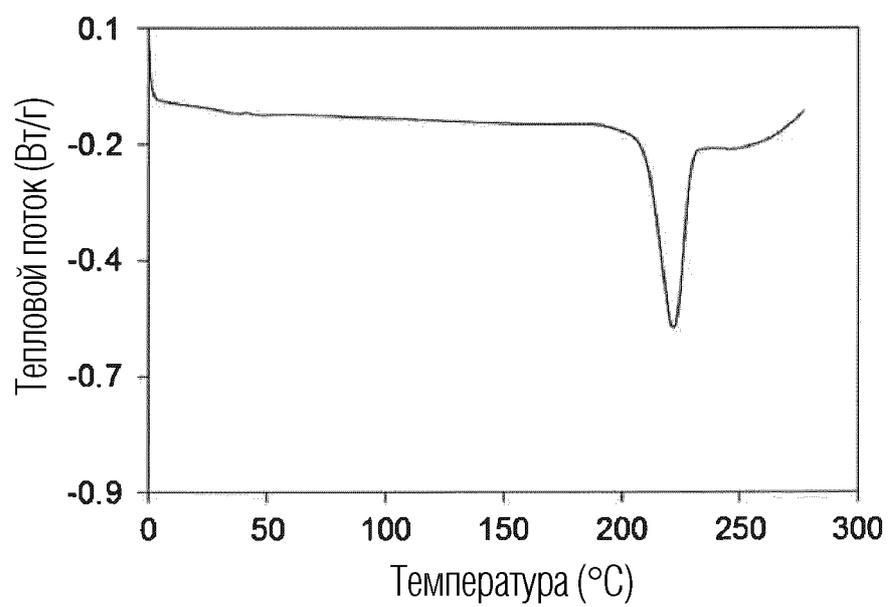
ФИГ. 4



ФИГ. 5

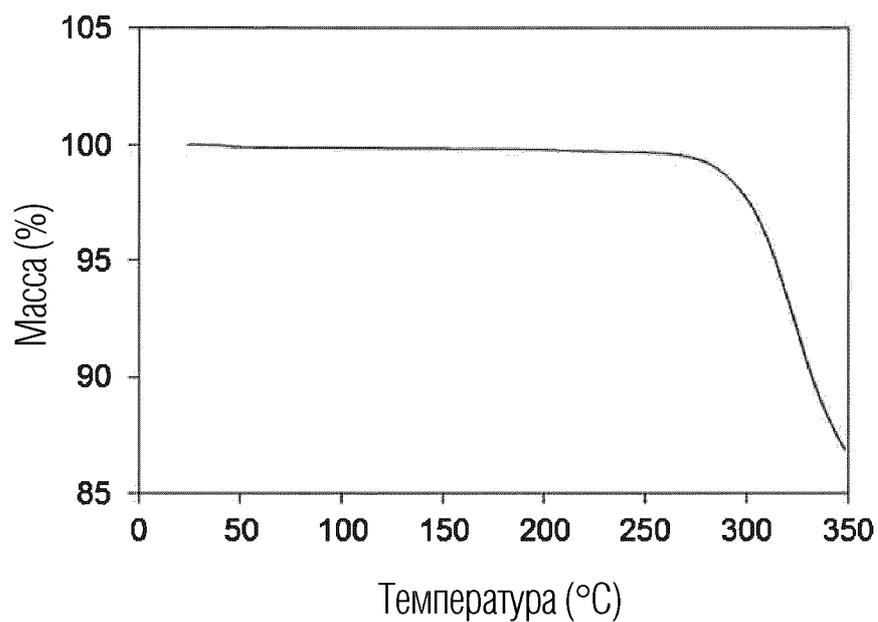


ФИГ. 6

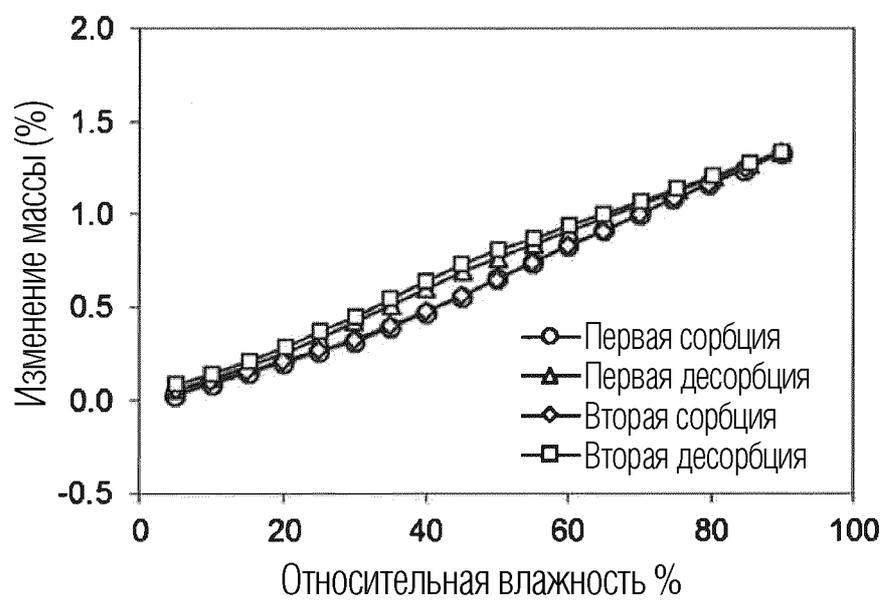


ФИГ. 7

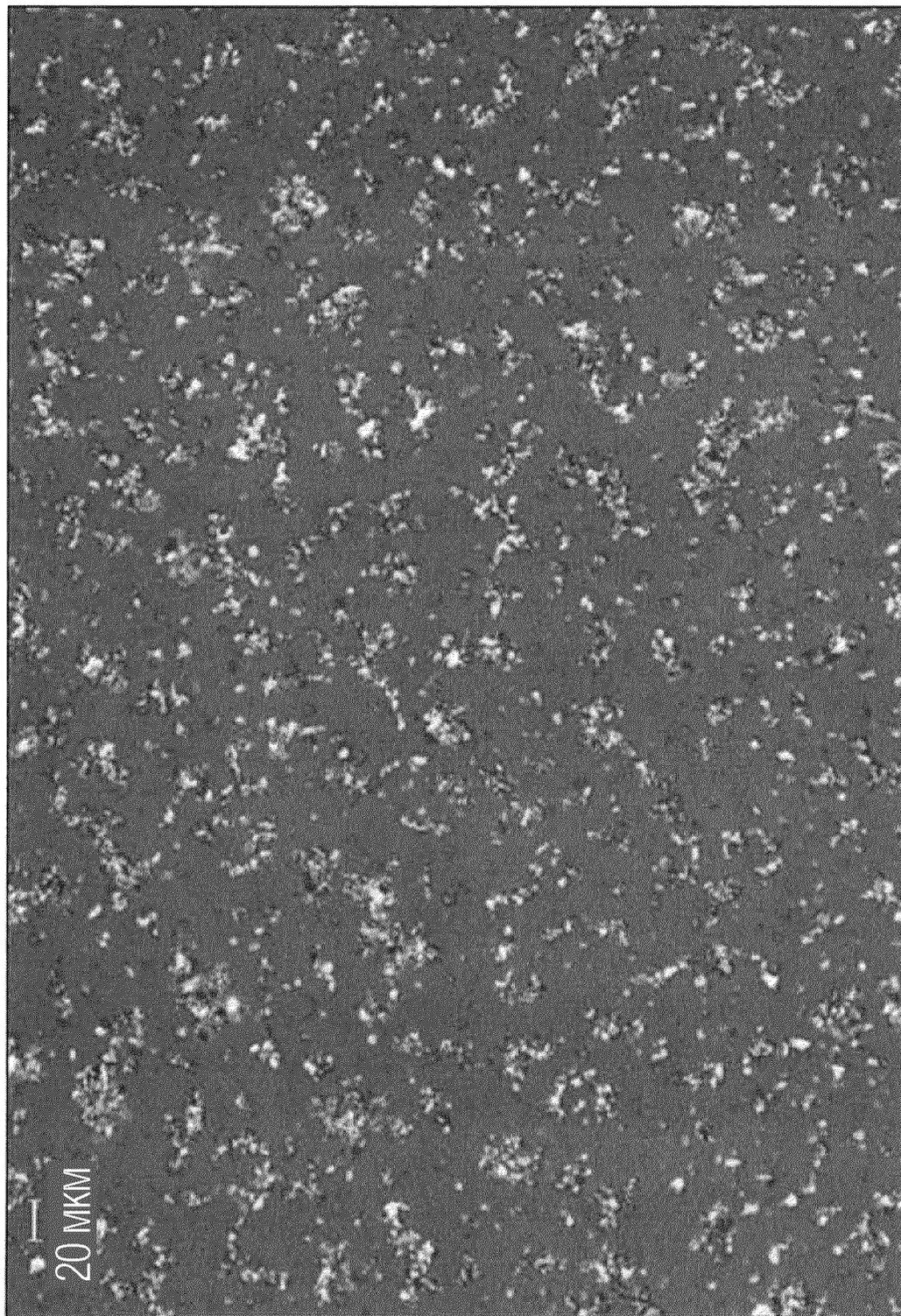
5/6



ФИГ. 8



ФИГ. 9



ФИГ. 10