

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090258 (13) A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.31

(51) Int. Cl. C07D 487/04 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2014.06.26

(54) ПРОИЗВОДНЫЕ ПИРРОЛО[3,2-d]ПИРИМИДИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ И ДРУГИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) 13174108.4

(32) 2013.06.27

(33) EP

(62) 201690093; 2014.06.26

(71) Заявитель:
ЯНССЕН САЙЕНСИЗ АЙРЛЭНД
ЮСИ (IE)

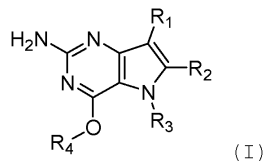
(72) Изобретатель:

Мак Гоуен Дэвид Крейг (BE),
Питерс Серж Мария Алоисиус (NL),
Ласт Стефан Жюльен, Эмбрехтс
Вернер, Йонкерс Тим Хьюго Мария,
Рабуассон Пьер Жан-Мари Бернар
(BE)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к производным пирроло[3,2-d]пиримидина формулы (I), способам их получения, фармацевтическим композициям и их применению в лечении и/или терапии заболеваний.



A2

202090258

202090258

A2

**ПРОИЗВОДНЫЕ ПИРРОЛО[3,2-*D*]ПИРИМИДИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ
ИНФЕКЦИЙ И ДРУГИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Настоящее изобретение относится к производным пирроло[3,2-*d*]пиримидина, способам их получения, фармацевтическим композициям и их применению в лечении и/или терапии заболеваний.

Настоящее изобретение относится к применению производных пирроло[3,2-*d*]пиримидина, более конкретно к применению производных пирроло[3,2-*d*]пиримидина в лечении вирусных инфекций, иммунных или воспалительных нарушений, в которые вовлечена модуляция или агонизм толл-подобных рецепторов (TLR). Толл-подобные рецепторы представляют собой основные трансмембранные белки, характеризующиеся внеклеточным доменом, богатым лейцином, и цитоплазматическим расширением, которое содержит консервативную область. Врожденная иммунная система может распознавать патоген-ассоциированные молекулярные паттерны посредством данных TLR, экспрессируемых на клеточной поверхности определенных типов иммунных клеток. При распознавании чужеродных патогенов активируется выработка цитокинов и повышается экспрессия ко-стимулирующих молекул на фагоцитах. Это приводит к модуляции поведения T-клеток.

Большинство видов млекопитающих имеют от десяти до пятнадцати типов толл-подобных рецепторов. В общей сложности у человека и мыши было идентифицировано тринадцать TLR (называемых просто TLR1-TLR13), и эквивалентные формы многих из них были обнаружены у других видов млекопитающих. Тем не менее, эквиваленты определенных TLR, обнаруженных у человека, не присутствуют у всех млекопитающих. Например, ген, кодирующий белок, аналогичный TLR10 человека, присутствует у мыши, но, по-видимому, в какой-то момент времени в прошлом был поврежден ретровирусом. С другой стороны, у мыши экспрессируются TLR 11, 12 и 13, ни один из которых не представлен у человека. У других млекопитающих могут экспрессироваться TLR, которые не обнаружены у человека. Другие виды, не являющиеся млекопитающими, могут иметь TLR, отличные от таковых у млекопитающих, о чем свидетельствует TLR14, обнаруженный у рыбы фугу рода Takifugu.

Это может осложнить процедуру использования экспериментальных животных в качестве моделей врожденного иммунитета человека.

Для обзора толл-подобных рецепторов см. следующие публикации в журналах: Hoffmann, J.A., *Nature*, 426, p.33-38, 2003; Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T., *Annual Rev. Immunology*, 21, p.335-376, 2003; Ulevitch, R. J., *Nature Reviews: Immunology*, 4, p.512-520, 2004.

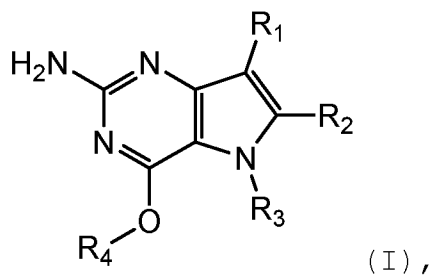
Ранее были описаны соединения, проявляющие активность в отношении толл-подобных рецепторов, такие как гетероциклические производные в WO2000/006577, производные аденина в WO98/01448 и WO99/28321, а также пиримидины в WO2009/067081.

При лечении определенных вирусных инфекций могут регулярно вводиться инъекции интерферона (IFN-альфа), как в случае с вирусом гепатита С (HCV). Низкомолекулярные индукторы IFN, доступные для перорального применения, предлагают потенциальные преимущества в виде сниженной иммуногенности и удобства введения. Таким образом, новые индукторы IFN представляют собой потенциально эффективный новый класс лекарственных средств для лечения вирусных инфекций. Пример низкомолекулярного индуктора IFN, обладающего противовирусным эффектом, см. у De Clercq, E.; Descamps, J.; De Somer, P. *Science* 1978, 200, 563-565.

Интерферон α также вводят пациентам в комбинации с другими лекарственными средствами при лечении определенных типов рака. Агонисты TLR 7/8 также представляют интерес как вакцинные адъюванты благодаря своей способности индуцировать ярко выраженную Th1 реакцию.

Тем не менее, существует острая потребность в новых модуляторах толл-подобных рецепторов, обладающих предпочтительной селективностью, а также улучшенным профилем безопасности, по сравнению с соединениями из известного уровня техники.

В соответствии с настоящим изобретением предусмотрено соединение формулы (I),



и его фармацевтически приемлемая соль, где

R₁ представляет собой H;

R₂ представляет собой H;

R₃ представляет собой C₁₋₆ алкил, замещенный C₁₋₆алкокси;

или где

R₃ представляет собой CH₂-арил, необязательно замещенный C₁₋₆алкокси;

R₄ представляет собой C₁₋₆алкил;

или где

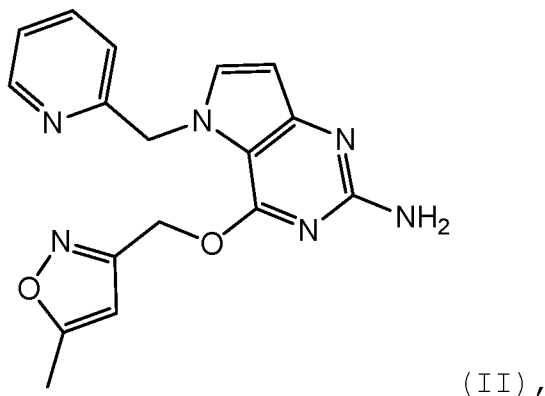
R₄ представляет собой CH₂-арил, замещенный C₁₋₆алкокси,

где термин «арил» означает ароматическую кольцевую структуру, необязательно содержащую один или два гетероатома, выбранных из N, O и S, и указанная ароматическая кольцевая структура может содержать 5 или 6 атомов в кольце.

Во втором варианте осуществления представлены соединения формулы (I), где R₃ представляет собой CH₂-арильные группы, необязательно дополнительно замещенные, как описано выше, а также R₁ и R₂ такие, как описаны выше.

Другими предпочтительными вариантами осуществления являются те соединения формулы (I), где R₂ представляет собой водород, а R₃ и R₄ являются такими, как описано выше.

Наиболее предпочтительным соединением является соединение формулы (II) со следующей химической структурой:



Соединения формулы (I) и (II) и их фармацевтически приемлемая соль, их сольват или полиморф обладают активностью фармацевтических препаратов, в частности, как модуляторов активности толл-подобного рецептора (в особенности, TLR7).

В дополнительном аспекте по настоящему изобретению предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) или (II), или его фармацевтически приемлемую соль, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями, разбавителями или носителями.

Кроме того, соединение формулы (I) или (II), или его фармацевтически приемлемую соль, в соответствии с настоящим изобретением, или фармацевтическую композицию, содержащую указанное соединение формулы (I) или (II), или его фармацевтически приемлемую соль можно применять в качестве лекарственного препарата.

Другой аспект настоящего изобретения состоит в том, что соединение формулы (I) или (II), или его фармацевтически приемлемую соль, или указанную фармацевтическую композицию, содержащую указанное соединение формулы (I) или (II), или его фармацевтически приемлемую соль можно, соответственно, применять в лечении какого-либо нарушения, в которое вовлечена модуляция TLR7.

Термин "алкил" относится к насыщенному алифатическому углеводороду с неразветвленной цепью или разветвленной цепью, содержащему определенное количество атомов углерода.

Термин "алкокси" относится к алкильной группе (цепи из атомов углерода и водорода), связанной одинарной связью с кислородом, как, например, метоксигруппе или этоксигруппе.

Термин "арил" означает ароматическую кольцевую структуру, необязательно содержащую один или два гетероатома, выбранных из N, O и S, в частности, из N и O. Указанная ароматическая кольцевая структура может содержать 5, 6 или 7 атомов в кольце. В частности, указанная ароматическая кольцевая структура может содержать 5 или 6 атомов в кольце.

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

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

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

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

случае пероральных жидких препаратов, таких как суспензии, сиропы, эликсиры, эмульсии и растворы; или твердые носители, такие как крахмалы, сахара, каолин, разбавители, смазывающие вещества, связующие вещества, разрыхлители и т. п., в случае порошков, пилюль, капсул и таблеток. Вследствие простоты их введения таблетки и капсулы представляют собой наиболее предпочтительные формы единиц дозирования для перорального введения, в случае которых, как очевидно, применяют твердые фармацевтические носители. Также включены препараты в твердой форме, которые могут быть преобразованы непосредственно перед применением в препараты в жидких формах. В композициях, приемлемых для чрескожного введения, носитель необязательно содержит средство, повышающее проницаемость, и/или приемлемое смачивающее средство, необязательно объединенное с приемлемыми добавками любой природы в минимальных пропорциях, при этом добавки не оказывают значительного вредного воздействия на кожу. Указанные добавки могут облегчать введение в кожу и/или могут быть полезными при получении необходимых композиций. Данные композиции можно вводить различными путями, например, в форме трансдермального пластыря, в форме точечного нанесения, в форме мази. Соединения по настоящему изобретению также можно вводить посредством ингаляции или инсуффляции с помощью способов и составов, применяемых в данной области для введения таким путем. Таким образом, в основном соединения по настоящему изобретению можно вводить в легкие в форме раствора, суспензии или сухого порошка.

Особенно предпочтительным является составление вышеуказанных фармацевтических композиций в виде единичной лекарственной формы для простоты введения и равномерности дозирования. Единичная лекарственная форма, как используется в данном документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз, при этом каждая единица содержит заранее установленное количество активного ингредиента, рассчитанное для получения требуемого терапевтического эффекта в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Примерами таких единичных лекарственных форм являются таблетки (в том числе

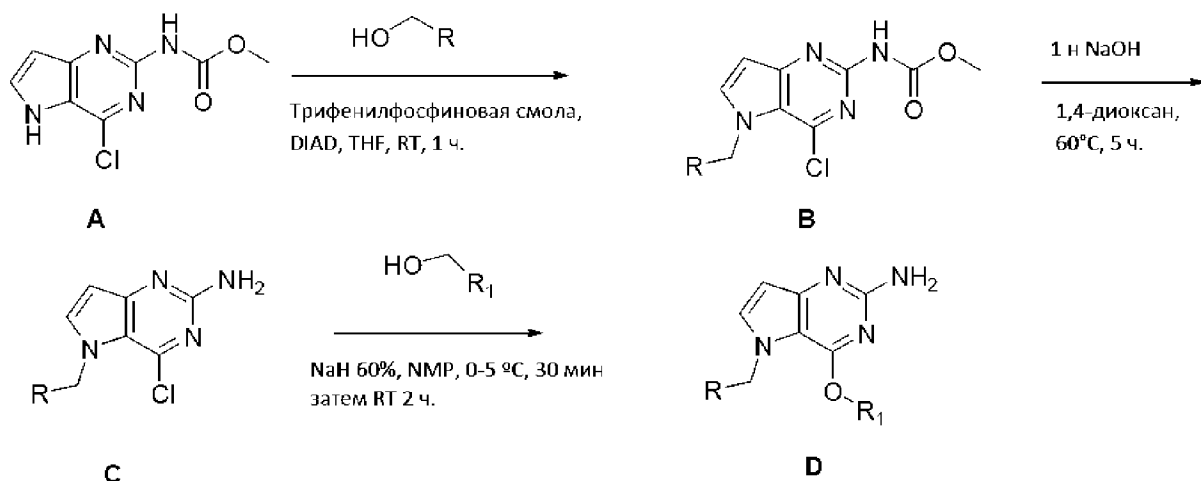
делимые или покрытые оболочкой таблетки), капсулы, пилюли, пакетики с порошком, пластинки, суппозитории, растворы или суспензии для инъекций и т. п., а также их отдельные множества.

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

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

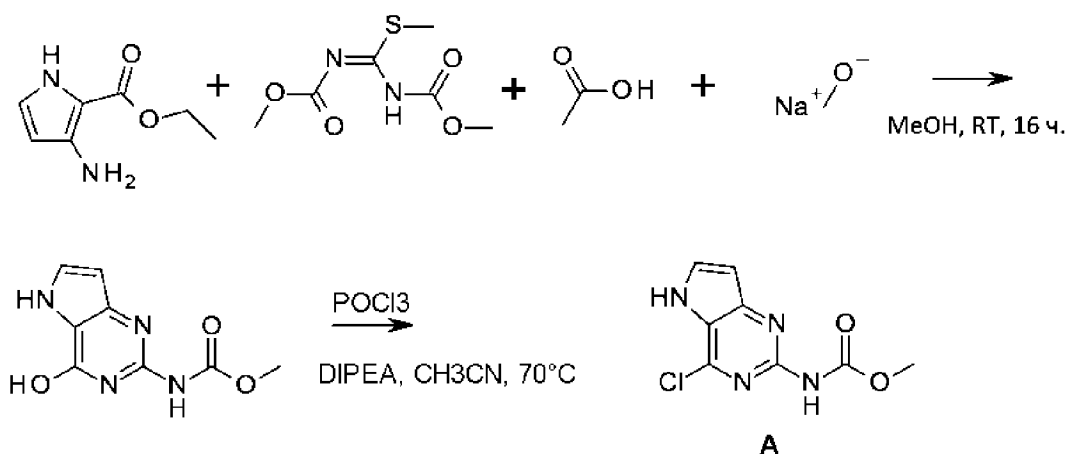
Экспериментальная часть

Схема 1. Общая схема реакции



Соединения типа **A** на схеме 1 могут быть функционализированы с помощью спиртов с использованием условий реакции Мицунобу в полярном апротонном растворителе, например, THF. Расщепление метилкарбамата осуществляли при основных условиях в 1,4-диоксане с образованием промежуточного соединения **C**. Осуществляли замещение хлора в **C** спиртом или основанием (например, NaH) в полярном апротонном растворителе (например, NMP) с образованием соединений типа **D**.

Получение промежуточного продукта A



Разделяли 3-амино-2-этоксикарбонилпиррола гидрохлорид (25,8 г, 135,3 ммоль) между дихлорметаном и насыщ. NaHCO_3 . Органический слой высушивали над MgSO_4 , твердую фазу удаляли путем фильтрации и растворитель фильтрата выпаривали досуха. Остаток растворяли в метаноле (500 мл) вместе с 1,3-бис(метоксикарбонил)-2-метил-2-тиопсевдомочевинной (32,1 г, 156 ммоль) и уксусной кислотой (39 мл, 677 ммоль) и перемешивали 1 час при комнатной температуре. Появлялся осадок, и перемешивание продолжали в течение ночи.

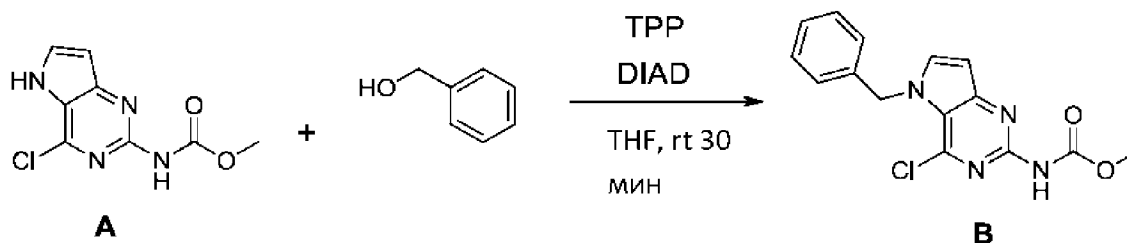
Добавляли метилат натрия (73,1 г, 1353 ммоль). Наблюдали экзотермическую реакцию и реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Доводили pH смеси до 5 с помощью уксусной кислоты и осадок выделяли посредством фильтрации, растирали на фильтре с водой (2×350 мл), ацетонитрилом (1×350 мл) и диизопропиловым эфиром (1×350 мл). Полученный метил-N-(4-гидрокси-5Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-2-ил)карбамат сушили в печи.

Метил-N-(4-гидрокси-5Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-2-ил)карбамат (25 г, 120 ммоль) распределяли в 350 мл ацетонитрила в 500 мл колбе с несколькими горлышками, оснащенной верхнеприводной мешалкой (300 об/мин) при комнатной температуре. Добавляли POCl₃ (22,1 мл, 238,2 ммоль) и затем реакционную смесь нагревали до 70°C при перемешивании. Добавляли по каплям диизопропилэтиламин (41,4 мл, 240,2 ммоль) с помощью шприцевого насоса при скорости потока 0,2 мл/мин.

Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и выливали в перемешиваемый раствор ацетата натрия (78,8 г, 961 ммоль) в воде (500 мл) при 45°C. Органические вещества выпаривали и оставшуюся жидкость перемешивали и охлаждали на ледяной бане. Образовавшееся твердое вещество выделяли посредством фильтрации, промывали ацетонитрилом и растирали с диизопропиловым эфиром с получением промежуточного соединения **A**, которое сушили в вакууме. LC-MS масса/заряд = 227 (M+H)

Получение промежуточного соединения B

Способ 1.



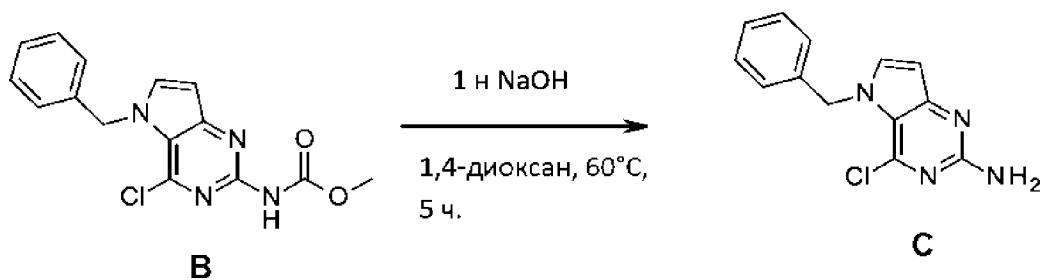
К суспензии **A** (500 мг, 2,2 ммоль), бензилового спирта (0,28 мл, 2,6 ммоль) и трифенилфосфина (0,69 г, 2,6 ммоль) в безводном THF (15 мл) добавляли DIAD (0,64 мл, 3,3 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной

температуре в течение 30 минут. Смесь концентрировали при пониженном давлении. Продукт очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с использованием градиента гептан/этилацетат; от 100-0 до 90-10. Фракции продукта собирали и концентрировали при пониженном давлении. Продукт растирали в порошок в диизопропиловом эфире, выделяли посредством фильтрации и сушили в вакууме до получения **B** в виде бледно-желтого твердого вещества. LC-MS масса/заряд = 317 (M+N)

Способ 2 со смолосвязанным трифенилфосфином.

К суспензии **A** (700 мг, 3,1 ммоль), бензилового спирта (0,39 мл, 3,7 ммоль) и трифенилфосфиновой смолы (2,6 г, 7,7 ммоль) в безводном THF (21 мл) добавляли DIAD (0,90 мл, 4,6 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Смесь фильтровали через уплотненный декалит и промывали метанолом. Фильтрат концентрировали *in vacuo*. Продукт растирали в порошок в диизопропиловом эфире, выделяли посредством фильтрации и сушили в вакууме до получения бледно-желтого твердого вещества, **B**. LC-MS масса/заряд = 317 (M+N)

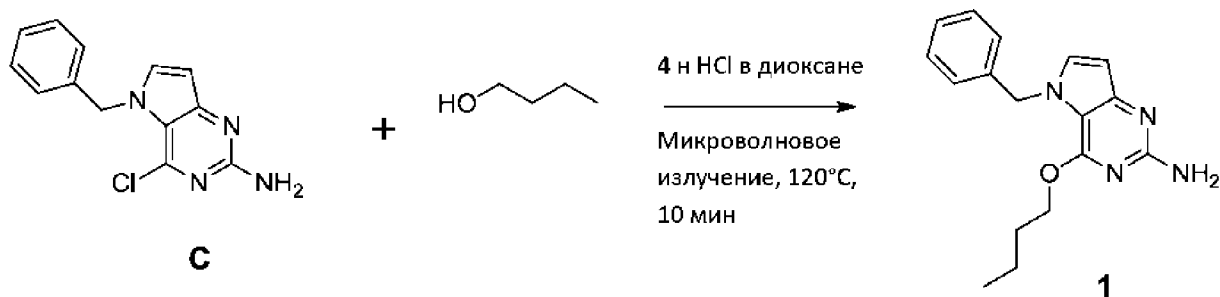
Получение промежуточного соединения C



B (738 мг, 2,3 ммоль) растворяли в 1,4-диоксане (11 мл) в 50 мл стеклянной пробирке и добавляли NaOH (5,6 мл, 1 н водн.). Смесь нагревали до 60°C в течение 5 ч. Смесь охлаждали и концентрировали *in vacuo*. Остаток обрабатывали водой и осадок выделяли посредством фильтрации и сушили в вакууме с получением **C** в виде твердого вещества. Продукт применяли как таковой на следующем этапе. LC-MS масса/заряд = 259 (M+N)

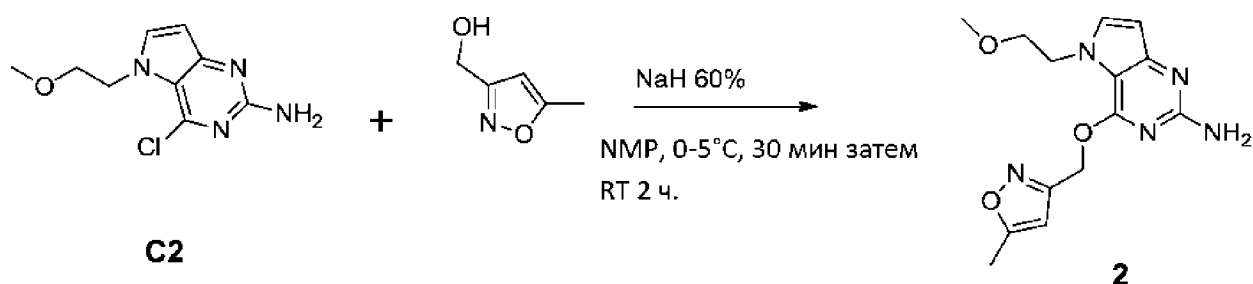
Получение **1** и **2**

Способ 1.



Промежуточное вещество **C** (240 мг, 0,93 ммоль), *n*-бутиловый спирт (3,2 мл, 35 ммоль) и 4 н НСl в диоксане (0,46 мл, 1,9 ммоль) помещали во флакон на 7 мл для реакций под действием микроволнового излучения. Флакон запечатывали и смесь нагревали в микроволнах при 120°C в течение 10 минут. Смесь охлаждали и концентрировали *in vacuo*. Остаток нейтрализовали с помощью насыщ. раствора NaHCO_3 и экстрагировали с помощью дихлорметана. Органический слой отделяли, высушивали (MgSO_4), твердые вещества удаляли посредством фильтрации и фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Продукт очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле с использованием дихлорметан-метанола с градиентом от 100-0 до 95-5. Лучшие фракции собирали и концентрировали при пониженном давлении. Продукт растирали в диизопропиловом эфире, твердое вещество выделяли посредством фильтрации и сушили в вакууме с получением **1** в виде белого твердого вещества.

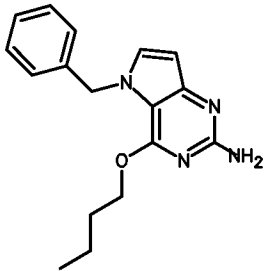
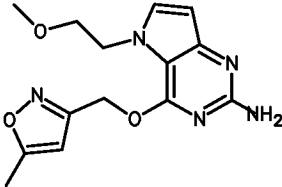
Способ 2.

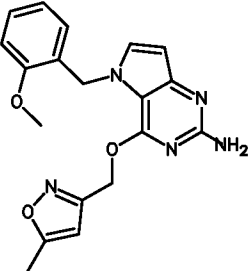
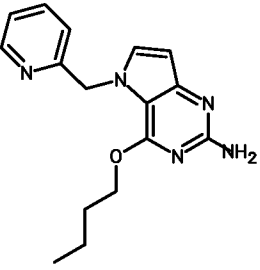


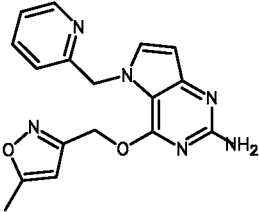
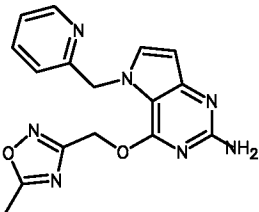
Промежуточное вещество **C2** (250 мг, 1,1 ммоль) и 3-гидроксиметил-5-метилизоксазол (0,16 мл, 1,65 ммоль) растворяли в NMP (3 мл) во флаконе на 7 мл. Смесь охлаждали на водяной бане и добавляли NaH (66 мг, 1,65 ммоль, 60% дисперсия в минеральном масле) в условиях N_2 , смесь перемешивали при 0-5°C в течение 30 минут, затем смеси позволяли нагреться до комнатной температуры

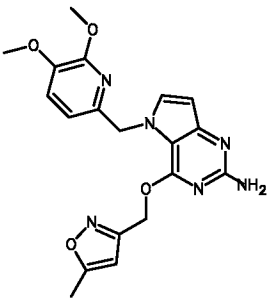
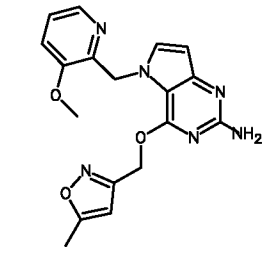
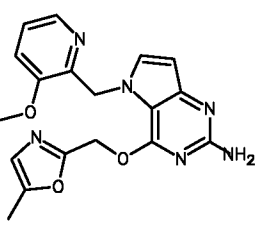
и продолжали перемешивание в течение 2 ч. Затем неочищенную реакционную смесь очищали препаративной HPLC (стационарная фаза: RP Vydac Denali C18 10 мкм, 200 г, 5 см), подвижная фаза: 0,25% раствор NH₄OAc в воде, CH₃CN), необходимые фракции собирали и концентрировали *in vacuo*. Продукт кристаллизовали из CH₃CN, выделяли посредством фильтрации и высушивали в вакууме с получением белого твердого вещества, **2**.

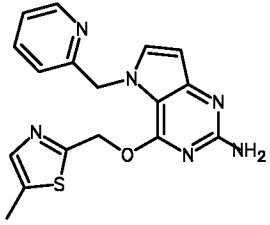
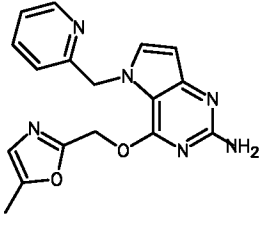
Таблица 1. Соединения формулы (I) и соответствующие данные анализа. Соединения получали в соответствии со способами, описанными в экспериментальной части.

№	СТРУКТУРА	¹ H ЯМР	Способ LC, Rt (минуты)	LC-MS Полученная масса (M+H)
1		¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 0,85 (t, J=7,37 Гц, 3H) 1,26 (dq, J=15,02, 7,39 Гц, 2 H) 1,56-1,63 (m, 2H) 4,30 (t, J=6,38 Гц, 2H) 5,39 (s, 2H) 5,72 (s, 2H) 6,08 (d, J=3,08 Гц, 1H) 7,03-7,08 (m, 2H) 7,19-7,25 (m, 1H) 7,26-7,32 (m, 2H) 7,48 (d, J=3,08 Гц, 1H)	B, 1,98	297
2		¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 2,41 (d, J=0,66 Гц, 3H) 3,17 (s, 3H) 3,57 (t, J=5,50 Гц, 2H) 4,29 (t, J=5,50 Гц, 2H) 5,50 (s, 2H) 5,82 (s, 2H) 6,03 (d, J=2,86	A, 0,69	304

№	СТРУКТУРА	^1H ЯМР	Способ ЛС, Rt (минуты)	ЛС-МС Полученная масса (M+H)
		Гц, 1H) 6,37 (d, J=0,88 Гц, 1H) 7,35 (d, J=2,86 Гц, 1H)		
3		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ppm 2,33-2,38 (m, 3H) 3,79 (s, 3H) 5,34 (s, 2H) 5,38 (s, 2H) 5,75 (s, 1H) 5,86 (s, 2H) 6,12 (d, J=3,08 Гц, 1H) 6,40-6,47 (m, 1H) 6,78 (td, J=7,48, 0,66 Гц, 1H) 7,00 (d, J=7,92 Гц, 1H) 7,24 (td, J=7,80, 1,80 Гц, 1H) 7,43 (d, J=2,86 Гц, 1H)	B, 1,62	366
4		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ppm 0,77 (t, J=7,4 Гц, 3H), 1,12 (dq, J=15,0, 7,4 Гц, 2H), 1,40-1,50 (m, 2H), 4,21 (t, J=6,4 Гц, 2H), 5,49 (s, 2H), 5,73 6 (s, 2H), 6,11 (d, J=2,9 Гц, 1H), 6,65 (d, J=7,9 Гц, 1H), 7,21-7,28 (m, 1H), 7,47 (d, J=3,1	A, 0,81	298

№	СТРУКТУРА	¹ H ЯМР	Способ ЛС, Rt (минуты)	LC-MS Полученная масса (M+H)
		Гц, 1H), 7,69 (td, J=7,7, 1,8 Гц, 1H), 8,47-8,53 (m, 1H)		
5		¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO- d ₆) δ ppm 2,35 (s, 3H) 5,37 (s, 2H) 5,47 (s, 2H) 5,84-5,90 (m, 3H) 6,14 (d, J=2,86 Гц, 1H) 6,72 (d, J=7,92 Гц, 1H) 7,24 (dd, J=6,93, 4,95 Гц, 1H) 7,52 (d, J=3,08 Гц, 1H) 7,65 (td, J=7,70, 1,76 Гц, 1H) 8,47 (d, J=4,18 Гц, 1H)	В, 1,29	337
6		¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO- d ₆) δ ppm 2,57 (s, 3H) 5,45 (s, 2H) 5,51 (s, 2H) 5,85 (s, 2H) 6,13 (d, J=2,86 Гц, 1H) 6,85 (d, J=7,70 Гц, 1H) 7,22 (dd, J=7,04, 5,06 Гц, 1H) 7,52 (d, J=3,08 Гц, 1H) 7,64 (td, J=7,65, 1,65 Гц, 1H) 8,43 (d, J=4,18 Гц, 1H)	В, 1,14	338

№	СТРУКТУРА	¹ H ЯМР	Способ ЛС, Rt (минуты)	LC-MS Полученная масса (M+H)
7		¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 2,36 (s, 3H) 3,74 (s, 3H) 3,71 (s, 3H) 5,29 (s, 2H) 5,40 (s, 2H) 5,85 (s, 2H) 5,93 (s, 1H) 6,12 (d, J=3,08 Гц, 1H) 6,29 (d, J=7,92 Гц, 1H) 7,11 (d, J=7,92 Гц, 1H) 7,50 (d, J=3,08 Гц, 1H)	B, 1,45	397
8		¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 2,36 (s, 3H) 3,80 (s, 3H) 5,31 (s, 2H) 5,48 (s, 2H) 5,75-5,81 (m, 3H) 6,07 (d, J=2,86 Гц, 1H) 7,25 (dd, J=8,25, 4,73 Гц, 1H) 7,36-7,41 (m, 2H) 7,90 (dd, J=4,73, 0,99 Гц, 1H)	A, 0,72	367
9		¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 2,23 (d, J=1,10 Гц, 3H) 3,77 (s, 3H) 5,32 (s, 2H) 5,45 (s, 2H) 5,77 (s, 2H) 6,07 (d, J=2,86 Гц, 1H) 6,79 (d, J=1,10 Гц, 1H) 7,21 (dd, J=8,25, 4,73 Гц, 1H) 7,33 (dd, J=8,36,	B, 1,26	367

№	СТРУКТУРА	¹ H ЯМР	Способ ЛС, Rt (минуты)	LC-MS Полученная масса (M+H)
		1,32 Гц, 1H) 7,37 (d, J=2,86 Гц, 1H) 7,88 (dd, J=4,73, 1,21 Гц, 1H)		
10		¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO- d ₆) δ ppm 2,34-2,41 (m, 3H) 5,49 (s, 2H) 5,58 (s, 2H) 5,88 (s, 2H) 6,15 (d, J=2,86 Гц, 1H) 6,72 (d, J=7,92 Гц, 1H) 7,20-7,25 (m, 1H) 7,43 (d, J=1,10 Гц, 1H) 7,52 (d, J=2,86 Гц, 1H) 7,63 (td, J=7,70, 1,76 Гц, 1H) 8,46 (dd, J=4,73, 0,77 Гц, 1H)	В, 1,28	353
11		¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO- d ₆) δ ppm 2,24 (s, 3H) 5,39 (s, 2H) 5,43 (s, 2H) 5,85 (s, 2H) 6,13 (d, J=2,86 Гц, 1H) 6,76 (d, J=7,70 Гц, 1H) 6,81 (s, 1H) 7,21 (dd, J=6,93, 5,17 Гц, 1H) 7,52 (d, J=2,86 Гц, 1H) 7,62 (td, J=7,65, 1,43 Гц, 1H) 8,40-8,45 (m, 1H)	В, 1,18	337

LCMS Общая Процедура

Измерения в ходе высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) проводили с помощью насоса для LC, детектора на диодной матрице (DAD) или УФ-детектора и колонки, как определено в соответствующих способах. При необходимости включали дополнительные детекторы (см. приведенную ниже таблицу способов).

Поток из колонки направляли в масс-спектрометр (MS), который был оснащен источником ионизации атмосферного давления. В компетенции специалиста в данной области находилась установка настраиваемых параметров (например, диапазона сканирования, минимального времени измерения и т.п.) с целью получения ионов, обеспечивающих определение номинального моноизотопного молекулярного веса (MW) соединения. Сбор данных проводили с помощью соответствующего программного обеспечения.

Соединения описывали по их экспериментальному времени удерживания (R_t) и ионам. Если не указано иное, в таблице данных указанный молекулярный ион соответствует $[M+H]^+$ (протонированная молекула) и/или $[M-H]^-$ (депротонированная молекула). В случае, если соединение не было непосредственно способно к ионизации, указывали тип аддукта (т.е. $[M+NH_4]^+$, $[M+HCOO]^-$ и т.п.). Для молекул со сложными изотопными распределениями (Br, Cl..) описанное значение является таковым, которое получено для наименьшей изотопной массы. Все результаты получали с экспериментальными погрешностями, которые обычно ассоциированы с применяемым способом.

Далее в настоящем документе "SQD" означает одиночный квадрупольный детектор, "MSD" означает масс-селективный детектор, "к.т." означает комнатную температуру, "BEH" означает мостиковый гибрид этилсилексан/диоксид кремния, "DAD" означает детектор на диодной матрице, "HSS" означает диоксид кремния повышенной прочности, "Q-ToF" означает квадрупольные времяпролетные масс-спектрометры, "CLND", означает хемилюминесцентный азотный детектор, "ELSD" означает испарительный детектор светорассеяния,

Коды способов LC-MS (поток выражен в мл/мин.; температура

колонок (Col T) в °C; время анализа в минутах)

Код способа	Прибор	Колонка	Подвижная фаза	Градиент	Пото к ---- --- Т КОЛО нки	Время анализа
A	Waters: Acquity® UPLC® -DAD и SQD	Waters: BEH C18 (1,7 мкм, 2,1*50 мм)	А: 10 мМ CH ₃ COONH ₄ в 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN В: CH ₃ CN	От 95% А до 5% А за 1,3 мин., выдержив ание в течение 0,7 мин.	0,8 ---- --- 55	2
B	Waters: Acquity® UPLC® -DAD и SQD	Waters: HSS T3 (1,8 мкм, 2,1*100 мм)	А: 10 мМ CH ₃ COONH ₄ в 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN В: CH ₃ CN	От 100% А до 5% А за 2,10 мин., до 0% А за 0,90 мин., до 5% А за 0,5 мин.	0,8 ---- --- 55	3,5

Биологическая активность соединений формулы (I) и (II)

Описание биологических анализов

Оценка активности TLR7 и TLR8

Способность соединений активировать TLR7 и/или TLR8 человека оценивали в клеточном анализе репортерного гена с использованием клеток HEK293, временно трансфицированных вектором экспрессии TLR7 или TLR8 и репортерной конструкцией NFκB-luc.

Вкратце, клетки HEK293 выращивали в культуральной среде

(DMEM, дополненной 10% FCS и 2 мМ глутамин). Для трансфекции клеток в 15 см чашках клетки отделяли трипсином-EDTA, трансфицировали смесью плазмиды CMV-TLR7 или TLR8 (1700 нг), плазмиды NFκB-luc (850 нг) и трансфекционного реагента и инкубировали в течение 48 ч. при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Трансфицированные клетки затем отмывали в PBS, отделяли трипсином-EDTA и ресуспендировали в среде с плотностью 1,25 × 10⁵ клеток/мл. Сорок микролитров клеток затем распределяли в каждую лунку в 384-луночных планшетах, где уже содержалось 200 нл соединения в 100% DMSO. После 6 часов инкубации при 37°C, 5% CO₂, определяли люциферазную активность путем добавления в каждую лунку 15 мкл субстрата Steady Lite Plus (Perkin Elmer) и выполняли считывание показаний на устройстве для визуализации микропланшетов ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Кривые зависимости доза-эффект строили на основе измерений, выполненных в четырех повторностях. Для каждого соединения определяли значения наиболее низких эффективных концентраций (LEC), определяемых как концентрация, которая индуцирует эффект по меньшей мере в два раза превышающий стандартное отклонение анализа.

Токсичность соединений определяли параллельно в 384-луночных планшетах с использованием аналогичной серии разведений соединения с клетками, трансфицированными только конструкцией CMV-TLR7 (1,25 × 10⁵ клеток/мл), из расчета 40 мкл на лунку. Жизнеспособность клеток измеряли после 6 часов инкубации при 37°C, 5% CO₂, путем добавления 15 мкл ATP lite (Perkin Elmer) на лунку и считывания показаний на устройстве для визуализации микропланшетов ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Данные отмечали в виде CC₅₀.

Параллельно использовали аналогичную серию разведения соединения (200 нл соединения в 100% DMSO) с клетками, трансфицированными только репортерной конструкцией NFκB-luc (1,25 × 10⁵ клеток/мл), из расчета 40 мкл на лунку. Через шесть часов после инкубации при 37°C, 5% CO₂, определяли люциферазную активность путем добавления 15 мкл субстрата Steady Lite Plus

(Perkin Elmer) в каждую лунку и выполняли считывание показаний на устройстве для визуализации микропланшетов ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Данные обратного скрининга отмечали в виде LEC.

Активация промоторных элементов ISRE

Способность соединений индуцировать IFN-I также оценивали посредством определения активации интерферон-зависимых регуляторных элементов (ISRE) при использовании кондиционированных сред от PBMC. Элемент ISRE с последовательностью GAAACTGAAACT высокочувствителен к фактору транскрипции STAT1-STAT2-IRF9, активируемому после связывания IFN-I с его рецептором IFNAR (Clontech, PT3372-5W). Плазмида pISRE-Luc от Clontech (№ по кат. 631913) содержит 5 копий данного элемента ISRE, за которыми следует ORF люциферазы светлячка. Получали клеточную линию HEK293, стабильно трансфицированную pISRE-Luc (HEK-ISREluc), для анализа кондиционированных сред клеточной культуры PBMC.

Вкратце, PBMC получали из лейкоцитарных пленок по меньшей мере двух доноров с применением стандартного протокола центрифугирования с фиколлом. Выделенные PBMC ресуспендировали в среде RPMI, дополненной 10% сыворотки АВ человека, и 2×10^5 клеток/лунка распределяли в 384-луночных планшетах, содержащих соединения (общий объем 70 мкл). После инкубации в течение ночи 10 мкл надосадочной жидкости переносили в 384-луночные планшеты, содержащие 5×10^3 клеток HEK-ISREluc/лунка в 30 мкл (высеянных за день до этого). После 24 часов инкубации активацию элементов ISRE измеряли посредством проведения анализа люциферазной активности с использованием 40 мкл/лунка субстрата Steady Lite Plus (Perkin Elmer) и измеряли с помощью устройства для визуализации микропланшетов ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Стимулирующую активность каждого соединения в отношении клеток HEK-ISREluc отмечали в виде величины LEC, определяемой как концентрация соединения, вносимая на PBMC, которая приводит к люциферазной активности, превышающей по меньшей мере в два раза стандартное отклонение анализа. LEC, в свою очередь, указывает на степень активации ISRE при переносе определенного количества

культуральной среды РВМС. Рекомбинантный интерферон α -2a (Roferon-A) использовали в качестве стандартного контрольного соединения.

Таблица 2. Активность соединений формулы (I).

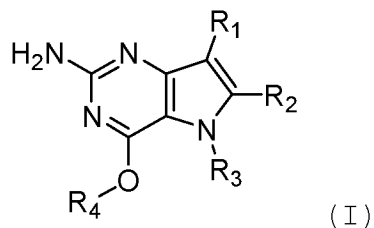
Все соединения демонстрировали $CC_{50} > 24$ мкМ.

№	TLR 7 человека (LEC), мкМ	TLR 8 человека (LEC) мкМ	HEK-ISRE luc (LEC) мкМ
1	0,6	>25	0,4
2	2,7	>25	0,5
3	0,1	>25	0,03
4	1,4	>25	0,6
5	0,4	>25	0,1
6	3,9	>25	2
7	0,08	>25	0,03
8	0,03	>25	0,01
9	0,07	>25	NA
10	0,5	>25	NA
11	0,6	>25	NA

NA = данные отсутствуют

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения соединения формулы (I),



и его фармацевтически приемлемой соли, где

R₁ представляет собой H, фтор или метил;

R₂ представляет собой H, галоген или C₁₋₃алкил;

R₃ представляет собой C₁₋₆ алкил, замещенный C₁₋₆алкокси;

или R₃ представляет собой алкиларил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, независимо выбранными из галогена, арилокси, арила, алкиламино, диалкиламино, C₁₋₆алкила, -CO₂H, -CO₂C₁₋₆ алкила, -CO₂NH₂, -SO₂NH₂, -CN и C₁₋₆алкокси; и

R₄ представляет собой C₁₋₆алкил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, независимо выбранными из гидроксила, C₁₋₆алкила, C₃₋₇ циклоалкила, C₂₋₆алкенила или арила, необязательно дополнительно замещенного C₁₋₆алкилом, и C₃₋₇ циклоалкила, необязательно дополнительно замещенного C₁₋₆алкилом;

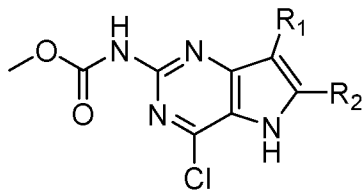
или R₄ представляет собой алкиларил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, независимо выбранными из галогена, арилокси, арила, алкиламино, диалкиламино, C₁₋₆алкила, -CO₂H, -CO₂C₁₋₆ алкила, -CO₂NH₂, -SO₂NH₂, -CN и C₁₋₆алкокси,

при условии, что когда R₄ представляет собой C₁₋₆алкил, то R₃ представляет собой C₁₋₆ алкил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, независимо выбранными из арилокси, гетероцикла, галогена, арила, алкиламино, диалкиламино, C₁₋₆алкила, -CO₂H, -CO₂C₁₋₆ алкила, -CO₂NH₂, -SO₂NH₂, -CN и C₁₋₆алкокси;

где термин «арил» означает ароматическую кольцевую структуру, необязательно содержащую один или два гетероатома, выбранных из N, O и S, и указанная ароматическая кольцевая структура может содержать 5 или 6 атомов в кольце;

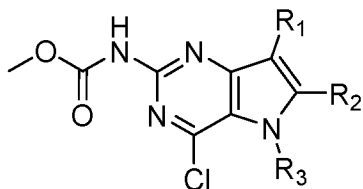
включающий

1) взаимодействие соединения формулы (А)



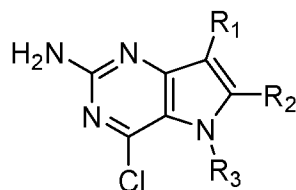
(А)

с R₃-ОН с получением соединения формулы (В) :



(В) ;

2) взаимодействие соединения формулы В с основанием с получением соединения формулы (С) :



(С) ; и

3) взаимодействие формулы С с R₄-ОН с получением соединения формулы (I) .

2. Способ по п.1, где:

R₁ представляет собой Н;

R₂ is представляет собой Н;

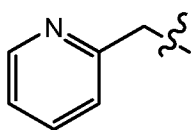
R₃ представляет собой C₁₋₆ алкил, замещенный C₁₋₆алкокси;

или где R₃ представляет собой СН₂-арил, необязательно замещенный C₁₋₆алкокси; и

R₄ представляет собой C₁₋₆ алкил;

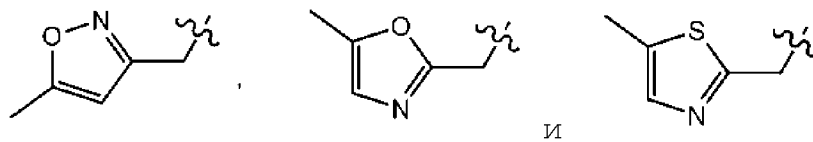
или где R₄ представляет собой СН₂-арил, замещенный C₁₋₆ алкилом.

3. Способ по п.1, где R₃ представляет собой

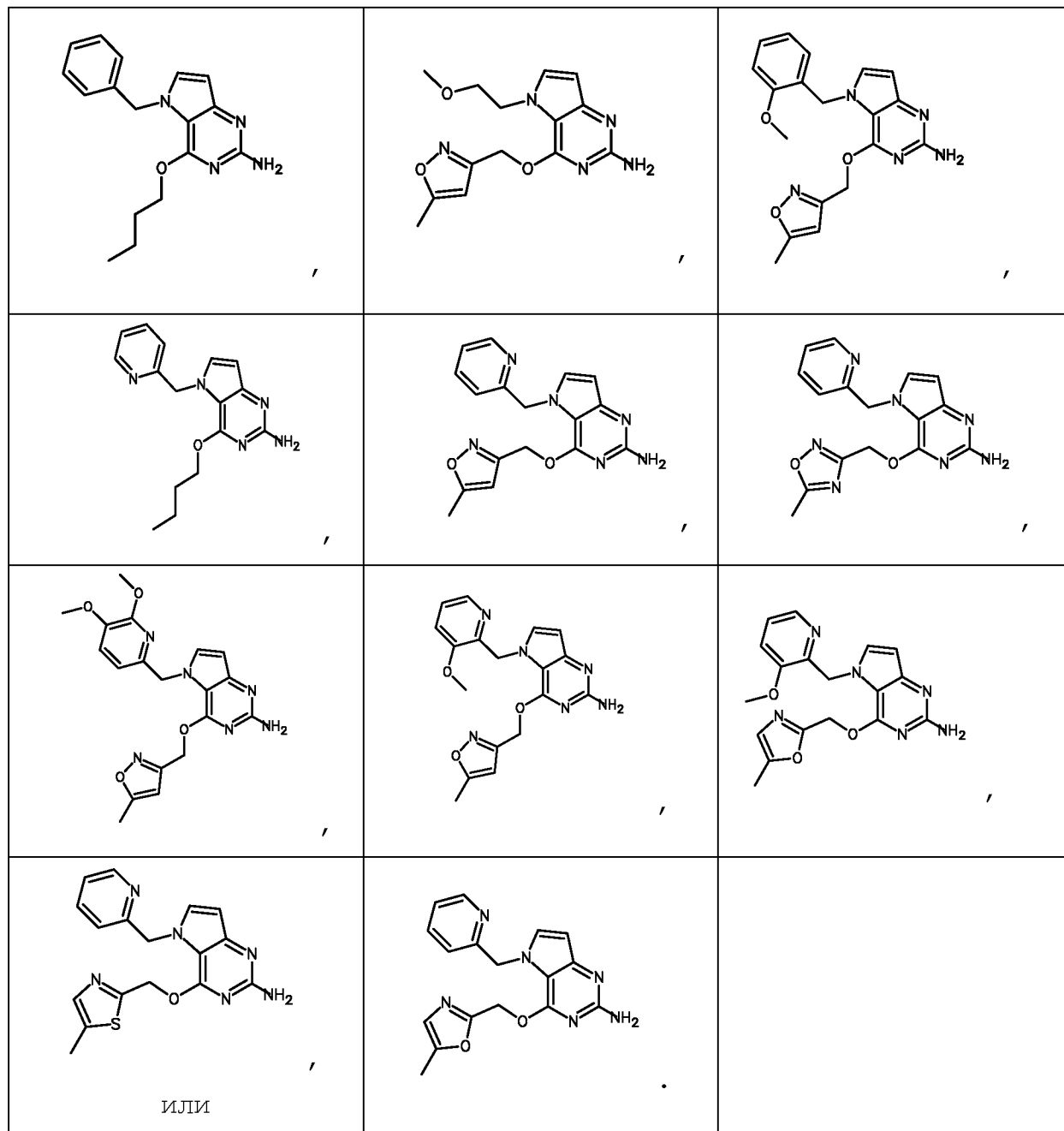


необязательно замещенный алкокси.

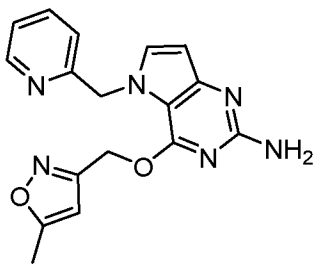
4. Способ по п.1, где R₄ выбирают из группы, включающей:



5. Способ по п.1, где соединение формулы (I) выбирают из группы, включающей:



6. Способ по п.1, где соединение формулы (I) имеет следующую химическую структуру:



7. Способ по п.1, где стадия 1 включает взаимодействие соединения формулы (A) и R_3-OH с диалкиловым эфиром диазендикарбоновой кислоты и трифенилфосфином.

8. Способ по п.7, где диалкиловый эфир диазендикарбоновой кислоты представляет собой DIAD.

9. Способ по п.1, где стадия 3 включает взаимодействие соединения формулы (C) и R_4-OH с кислотой в нагретых условиях.

10. Способ по п.1, где стадия 3 включает взаимодействие соединения формулы (C) и R_4-OH с основанием.

По доверенности