

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 037031

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.01.28

(21) Номер заявки
201991456

(22) Дата подачи заявки
2017.12.21

(51) Int. Cl. C07D 401/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) ИМИДАЗОПИРАЗИНОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ ТИРОЗИНКИНАЗЫ БРУТОНА

(31) 62/437,633; 62/569,028

(32) 2016.12.21; 2017.10.06

(33) US

(43) 2019.11.29

(86) PCT/IB2017/058319

(87) WO 2018/116259 2018.06.28

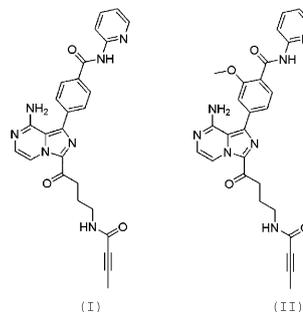
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АСЕРТА ФАРМА Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Подолл Терри, Эвартс Джерри (US),
Каптейн Аллард (NL)

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

(56) WO-A2-2015110923
EP-A1-2548877
WO-A1-2013010869
WO-A1-2016109223
WO-A1-2016106627
WO-A2-2008039218

(57) В некоторых вариантах изобретение относится к соединениям формулы (I) и (II) или их фармацевтически приемлемой соли и к их применению в терапии. В частности, в некоторых вариантах данное изобретение относится к соединениям формулы (I) и (II) или их фармацевтически приемлемой соли и к их применению в лечении гиперпролиферативного расстройства, воспалительного расстройства, иммунного расстройства или аутоиммунного расстройства. Соединения формулы (I) и (II) имеют следующие структуры:



B1

037031

037031

B1

Область техники

В некоторых вариантах данное изобретение относится к соединениям формулы (I) и (II), к фармацевтическим композициям, содержащим эти соединения и к их применению в терапии. В некоторых вариантах, данное изобретение относится к применению соединения формулы (I) или (II) или фармацевтически приемлемой соли в лечении гиперпролиферативного расстройства, воспалительного расстройства, иммунного расстройства или аутоиммунного расстройства.

Уровень техники

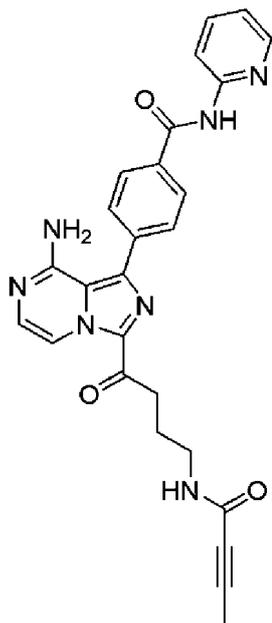
Тирозинкиназа Брутона (ТКБ) является нерецепторной тирозинкиназой семейства Тес, экспрессируемой в В клетках и миелоидных клетках. Результаты исследований подтверждают ключевую роль ТКБ в регулировании образования антител в аутоиммунных заболеваниях. Также, ингибирование ТКБ, по видимому, имеет отношение, в частности, к В-клеточным лимфомам из-за хронической активной подачи сигналов BCR, как описано у Davis, et al., Nature, 2010, 463, 88-94.

Во многих солидных опухолях, поддерживающая микросреда (которая может составлять основную часть опухолевой массы) является динамической силой, которая позволяет опухоли выживать. Опухолевая микросреда в основном определяется как сложная смесь "клеток, растворимых факторов, сигнальных молекул, внеклеточных матриц и механических сигналов, которые способствуют трансформации новообразования, поддерживают рост и инвазию опухоли, защищают опухоль от иммунитета хозяина, поддерживают терапевтическую резистентность и обеспечивают ниши для разрастания доминантных метастазов" как описано у Swartz, et al., Cancer Res., 2012, 72, 2473. Хотя опухоли экспрессируют антигены, которые должны распознаваться Т клетками, клиренс опухоли иммунной системой является редким из-за иммунного подавления микросредой. Обращаясь к самим опухолевым клеткам,

например, химиотерапия также оказалась недостаточной для преодоления защитных эффектов микросреды. Таким образом, срочно необходимы новые подходы для более эффективного лечения солидных опухолей, которые принимают во внимание роль микросреды.

Сущность изобретения

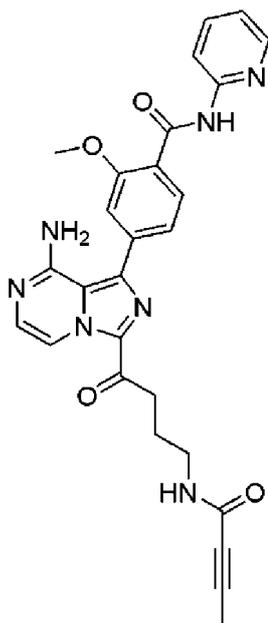
В одном аспекте, ингибитором ТКБ является соединение формулы (I), имеющее структуру:



(I)

или его фармацевтически приемлемая соль.

В другом аспекте, ингибитором ТКБ является соединение формулы (II), имеющее структуру:



(II)

или его фармацевтически приемлемая соль.

В еще одном аспекте, изобретение относится к применению соединения формулы (I) или (II) в лечении гиперпролиферативного расстройства, воспалительного расстройства, иммунного расстройства или аутоиммунного расстройства.

Краткое описание чертежей

Предшествующее краткое описание, а также последующее подробное описание изобретения будут лучше понятны при прочтении в сочетании с прилагаемыми чертежами.

На фиг. 1 показан ^1H - ^{13}C двух/трехполосный корреляционный ЯМР спектр соединения формулы (I).

На фиг. 2 показано действие соединения формулы (I) при изменении прединкубационного времени (0, 30 или 60 мин) и концентрации АТФ (5, 25 или 100 мкМ) в анализе ТКБ IMAP.

На фиг. 3 показана наблюдаемая IC_{50} соединения формулы (I) в течение времени для ТКБ дикого типа (ТКБ-ДТ) и мутанта ТКБ Cys481Ser (ТКБ-C481S) с применением анализа LanthaScreen.

На фиг. 4 показан дозозависимый эффект соединения формулы (I) на занятость мишени ТКБ в В клетках Ramos.

На фиг. 5 показаны первичные метаболические пути акалабрутиниба.

На фиг. 6 показан основной окислительный метаболический путь к M27 от акалабрутиниба.

На фиг. 7 показаны метаболические пути к M23 от акалабрутиниба.

На фиг. 8A и фиг. 8B вместе показаны пути биотрансформации акалабрутиниба у человека.

На фиг. 9 показано, что акалабрутиниб и M27 являются ковалентными ингибиторами ТКБ. На левой фигуре показано увеличение эффективности в течение времени для ТКБ-ДТ благодаря ковалентному связыванию в течение времени. На правой фигуре показано обратимое связывание (средство) соединений с ТКБ-C481S и не изменяется с течением времени. Разница в эффективности между ТКБ-ДТ и ТКБ-C481S показывает эффект ковалентного связывания.

На фиг. 10 показана занятость мишени (3М ТКБ)

акалабрутинибом и M27 в клетках Ramos.

На фиг. 11 показан анализ профиля KINOMEscan в однократной дозе (1 мкМ) M27 (DiscoverX scanMAX).

На фиг. 12 показаны метаболические пути к соединению формулы (II) от формулы (III).

Подробное описание изобретения

Несмотря на то, что в описании изобретения показаны и описаны предпочтительные варианты изобретения, такие варианты представлены только в качестве примера и никаким образом не ограничивают объем изобретения. Различные альтернативы описанных вариантов изобретения могут применяться в практике изобретения.

Если не указано иначе, все используемые технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится данное изобретение. Все цитированные патенты и публикации включены в качестве ссылки полностью.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к солям, полученным из множества органических и неорганических противоионов, известных в данной области техники.

Фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли могут быть образованы с неорганиче-

скими и органическими кислотами. Неорганические кислоты, из которых могут быть получены соли, включают, например, хлористоводородную кислоту,

бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту и фосфорную кислоту. Органические кислоты, из которых могут быть получены соли, включают, например, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, пировиноградную кислоту, щавелевую кислоту, малеиновую кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, коричную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, п-

толуолсульфоновую кислоту и салициловую кислоту. Фармацевтически приемлемые основно-аддитивные соли могут быть получены с неорганическими и органическими основаниями. Неорганические основания, из которых могут быть получены соли, включают,

например, натрий, калий, литий, аммоний, кальций, магний, железо, цинк, медь, марганец и алюминий. Органические основания, из которых могут быть получены соли, включают, например, первичные, вторичные и третичные амины, замещенные амины, включая встречающиеся в природе замещенные амины, циклические амины и основные ионообменные смолы. Конкретные примеры включают изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, триэтиламин,

трипропиламин и этаноламин. В выбранных вариантах,

фармацевтически приемлемые основно-аддитивные соли выбирают из аммония, калия, натрия, кальция и магния.

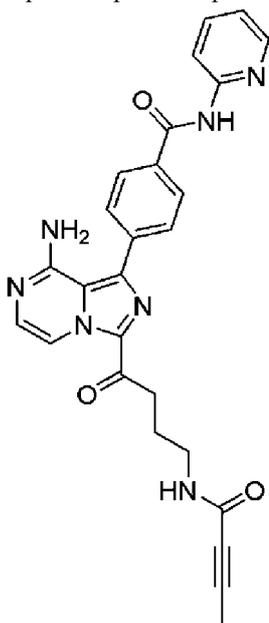
"Фармацевтически приемлемый носитель" или "фармацевтически приемлемый эксципиент" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и

противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какая-либо обычная среда или агент несовместим с активным ингредиентом, предполагается его использование в терапевтических композициях в соответствии с данным изобретением. Дополнительные активные ингредиенты также могут быть включены в описанные композиции.

Если в данном описании применяются интервалы, например, физических или химических свойств, таких как молекулярная масса или химические формулы, все сочетания и подсочетания интервалов и их конкретные варианты включены. Применение термина "около" в отношении числа или численного интервала означает, что число или численный интервал является приблизительным в пределах экспериментальной вариабельности (или в пределах статистической экспериментальной ошибки), и таким образом, число или численный интервал может варьироваться от, например, на 1%-15% от указанного числа или численного интервала. Термин "содержащий" (и родственные термины, такие как "содержит" или "содержать" или "имеющий" или "включающий") включают такие варианты, например, как вариант любой композиции вещества, способа или процесса, который "состоит из" или "состоит, по существу, из" описанных характеристик.

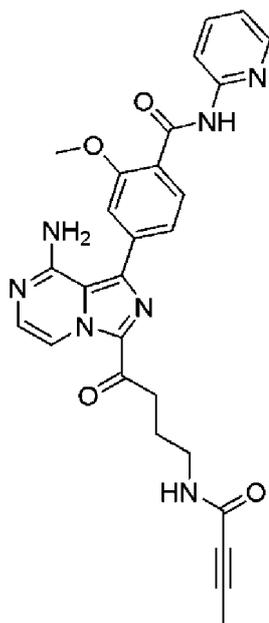
СОЕДИНЕНИЯ

В первом варианте представлено соединение формулы (I), также названное M27:



(I)

или его фармацевтически приемлемая соль; или соединение формулы (II):



(III)

или его фармацевтически приемлемая соль.

В одном варианте, ингибитором ТКБ является соединение, выбранное из групп, состоящей из: 4-(8-амино-3-(4-(бут-2-инамидо)бутаноил)имидазо[1,5-а]пиразин-1-ил)-N-(пиридин-2-ил)бензамида и 4-(8-амино-3-(4-(бут-2-инамидо)бутаноил)имидазо[1,5-а]пиразин-1-ил)-2-метокси-N-(пиридин-2-ил)бензамида.

В одном варианте, соединением является соединение формулы

(I) или его фармацевтически приемлемая соль.

В одном варианте, соединение является соединением формулы

(II) или его фармацевтически приемлемая соль.

Соединения и соли формулы (I) и (II) могут существовать в сольватированных формах и не сольватированных формах. Например, сольватированной формой может быть гидрированная форма, такая как полугидрат, моногидрат, дигидрат, тригидрат или их альтернативное количество.

Соединения и соли формулы (I) и (II) также включают кристаллические и аморфные формы соединений формулы (I) и (II), включая, например, полиморфы, псевдополиморфы, сольваты, гидраты, несольватированные полиморфы (включая ангидраты), конформационные полиморфы и аморфные формы соединений, а также их смеси. "Кристаллическая форма" и "полиморф" включают все кристаллические и аморфные формы соединения, включая, например, полиморфы, псевдополиморфы, сольваты, гидраты, несольватированные полиморфы (включая ангидраты),

конформационные полиморфы и аморфные формы соединений, а также их смеси, если не указана конкретная кристаллическая или аморфная форма.

В одном варианте представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, или соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение имеет выделенную форму.

Соединением формулы (I) или его фармацевтически приемлемой солью или формулы (II) или его фармацевтически приемлемой солью в "выделенной форме" является такое, которое практически не содержит другие компоненты, например, органические компоненты, найденные в живом организме.

В одном варианте представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, или соединение формулы (II)

или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение имеет высокую степень чистоты, по крайней мере, 90%, измеренную ВЭЖХ.

В одном варианте представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, или соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение имеет высокую степень чистоты, по крайней мере, 95%, измеренную ВЭЖХ.

В одном варианте представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, или соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение имеет высокую степень чистоты, по крайней мере, 96%, измеренную ВЭЖХ.

В одном варианте представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, или соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение имеет высокую степень чистоты, по крайней мере, 97%, измеренную ВЭЖХ.

В одном варианте представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, или соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение имеет высокую степень чистоты, по крайней мере, 98%, измеренную ВЭЖХ.

В одном варианте представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, или соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение имеет высокую степень чистоты, по крайней мере, 99%, измеренную ВЭЖХ.

В одном варианте представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, или соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение имеет высокую степень чистоты, по крайней мере, 10 0%, измеренную ВЭЖХ.

В одном варианте представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, или соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение получают ex-vivo.

"Ex-vivo" означает вне живого организма, например, человека, лечимого от рака или другого заболевания.

В одном варианте представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, или соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение получено органическим синтезом. Пути органического синтеза доступны для получения соединения формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой соли в относительно чистой форме, например, с чистотой 80% или больше, 90% или больше, 95% или больше, 96% или больше, 97% или больше, 98% или больше и 99% или больше, измеренной ВЭЖХ. Перекристаллизация и другие способы очистки могут проводиться для получения соединений, которые по существу на 100% чистые. Такие способы синтеза и методы очистки известны в данной области техники и иллюстрированы не ограничивающим образом в примерах, которые представлены ниже.

"Органический синтез" означает проведение синтетических реакций в лаборатории или на промышленном оборудовании с получением продукта.

В одном варианте, соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемая соль представлено в по существу чистой форме. По существу чистое означает, что соединения достаточно чисты для одобрения FDA и практически не содержат примеси или другие материалы, или альтернативно, имеют уровень примеси, который не оказывает неблагоприятное или неприемлемое действие на свойства соединений в отношении безопасности, эффективности, стабильности и других желаемых свойств.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

В выбранных вариантах, в изобретении представлены фармацевтические композиции для лечения солидных опухолей, лимфом и лейкозов.

Фармацевтические композиции обычно составлены для получения терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или (II) в качестве активных ингредиентов, или его фармацевтически приемлемой соли. Если желательно,

фармацевтические композиции содержат фармацевтически приемлемую соль и/или их координационный комплекс, и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов, носителей, включая инертные твердые разбавители и наполнители, разбавителей, включая стерильный водный раствор и различные органические растворители, улучшители проникновения, солюбилизаторы и адъюванты.

При желании, другие агенты могут быть смешаны в препарат, или оба компонента могут быть составлены в отдельные препараты для применения в сочетании отдельно или одновременно.

В выбранных вариантах, концентрация каждого соединения формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой соли, представленных в фармацевтических композициях в соответствии с данным изобретением, независимо меньше чем, например, 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% или 0,0001% масс./масс., масс./об. или об./об. по отношению к общей массе или объему фармацевтической композиции.

В выбранных вариантах, концентрация каждого соединения формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой соли, представленных в фармацевтических композициях в соответствии с данным изобретением, независимо больше чем 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19,75%, 19,50%, 19,25% 19%, 18,75%, 18,50%, 18,25% 18%, 17,75%, 17,50%, 17,25% 17%, 16,75%, 16,50%, 16,25% 16%, 15,75%, 15,50%, 15,25% 15%, 14,75%, 14,50%, 14,25% 14%, 13,75%, 13,50%, 13,25% 13%, 12,75%, 12,50%, 12,25% 12%, 11,75%, 11,50%, 11,25% 11%, 10,75%, 10,50%, 10,25% 10%, 9,75%, 9,50%, 9,25% 9%, 8,75%, 8,50%, 8,25% 8%, 7,75%, 7,50%, 7,25% 7%, 6,75%, 6,50%, 6,25% 6%, 5,75%, 5,50%, 5,25% 5%, 4,75%, 4,50%, 4,25%,

4%, 3,75%, 3,50%, 3,25%, 3%, 2,75%, 2,50%, 2,25%, 2%, 1,75%,

1,50%, 1,25%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%,

0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% от 0,0001% масс./масс., масс./об. или об./об. по отношению к общей массе или объему фармацевтической композиции.

В выбранных вариантах, концентрация каждого соединения формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой соли в

соответствии с данным изобретением независимо находится в интервале от приблизительно 0,0001% до приблизительно 50%, от приблизительно 0,001% до приблизительно 40%, от приблизительно 0,01% до приблизительно 30%, от приблизительно 0,02% до приблизительно 29%, от приблизительно 0,03% до приблизительно 28%, от приблизительно 0,04% до приблизительно 27%, от приблизительно 0,05% до приблизительно 26%, от приблизительно 0,06% до приблизительно 25%, от приблизительно 0,07% до приблизительно 24%, от приблизительно 0,08% до приблизительно 23%, от приблизительно 0,09% до приблизительно 22%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 21%, от приблизительно 0,2% до приблизительно 20%, от приблизительно 0,3% до приблизительно 19%, от приблизительно 0,4% до приблизительно 18%, от приблизительно 0,5% до приблизительно 17%, от приблизительно 0,6% до приблизительно 16%, от приблизительно 0,7% до приблизительно 15%, от приблизительно 0,8% до приблизительно 14%, от приблизительно 0,9% до приблизительно 12% или от приблизительно 1% до приблизительно 10% масс./масс, масс./об. или об./об. по отношению к общей массе или объему фармацевтической композиции.

В выбранных вариантах, концентрация каждого соединения формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с данным изобретением независимо находится в интервале от приблизительно 0,001% до приблизительно 10%, от приблизительно 0,01% до приблизительно 5%, от приблизительно 0,02% до приблизительно 4,5%, от приблизительно 0,03% до приблизительно 4%, от приблизительно 0,04% до приблизительно 3,5%, от приблизительно 0,05% до приблизительно 3%, от приблизительно 0,06% до приблизительно 2,5%, от приблизительно 0,07% до приблизительно 2%, от приблизительно 0,08% до приблизительно 1,5%, от приблизительно 0,09% до приблизительно 1%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 0,9% масс./масс, масс./об. или об./об. по отношению к общей массе или объему фармацевтической композиции.

В выбранных вариантах, количество каждого соединения формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой соли в

соответствии с данным изобретением независимо равно или меньше 3,0 г, 2,5 г, 2,0 г, 1,5 г, 1,0 г, 0,95 г, 0,9 г, 0,85 г, 0,8 г, 0,75 г, 0,7 г, 0,65 г, 0,6 г, 0,55 г, 0,5 г, 0,45 г, 0,4 г, 0,35 г, 0,3 г, 0,25 г, 0,2 г, 0,15 г, 0,1 г, 0,09 г, 0,08 г, 0,07 г, 0,06 г, 0,05 г, 0,04 г, 0,03 г, 0,02 г, 0,01 г, 0,009 г, 0,008 г, 0,007 г, 0,006 г, 0,005 г, 0,004 г, 0,003 г, 0,002 г, 0,001 г, 0,0009 г, 0,0008 г, 0,0007 г, 0,0006 г, 0,0005 г, 0,0004 г, 0,0003 г, 0,0002 г или 0,0001 г.

В выбранных вариантах, количество каждого соединения формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с данным изобретением независимо больше 0,0001 г, 0,0002 г, 0,0003 г, 0,0004 г, 0,0005 г, 0,0006 г, 0,0007 г, 0,0008 г, 0,0009 г, 0,001 г, 0,0015 г, 0,002 г, 0,0025 г, 0,003 г, 0,0035 г, 0,004 г, 0,0045 г, 0,005 г, 0,0055 г, 0,006 г, 0,0065 г, 0,007 г, 0,0075 г, 0,008 г, 0,0085 г, 0,009 г, 0,0095 г, 0,01 г, 0,015 г, 0,02 г, 0,025 г, 0,03 г, 0,035 г, 0,04 г, 0,045 г, 0,05 г, 0,055 г, 0,06 г, 0,065 г, 0,07 г, 0,075 г, 0,08 г, 0,085 г, 0,09 г, 0,095 г, 0,1 г, 0,15 г, 0,2 г, 0,25 г, 0,3 г, 0,35 г, 0,4 г, 0,45 г, 0,5 г, 0,55 г, 0,6 г, 0,65 г, 0,7 г, 0,75 г, 0,8 г, 0,85 г, 0,9 г, 0,95 г, 1 г, 1,5 г, 2 г, 2,5 г или 3 г.

Каждое соединение формулы (I) или (II) или фармацевтически приемлемая соль в соответствии с данным изобретением эффективно в широком диапазоне дозирования. Например, при лечении взрослого человека, дозы независимо варьируются от 0,01 до 1000 мг, от 0,5 до 100 мг, от 1 до 50 мг в сутки, и от 5 до 40 мг в сутки являются примерами применяемых доз. Точная доза зависит от способа введения, формы, в которой вводят соединение, пола и возраста лечимого субъекта, массы тела лечимого субъекта и предпочтения и опыта наблюдающего терапевта.

Ниже описаны не ограничивающие фармацевтические композиции и способы их получения.

ДОЗЫ И РЕЖИМЫ ВВЕДЕНИЯ

Вводимое количество соединения формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой соли зависит от лечимого млекопитающего, тяжести расстройства или состояния, скорости

введения, расположения соединений и усмотрения прописывающего врача. Однако эффективная доза находится в интервале от около 0,001 до около 100 мг на кг массы тела в сутки, например, от около 1 до около 35 мг/кг/сутки, одной или несколькими дозами. Для человека массой 70 кг, это количество составит от около 0,05 до 7 сутки, например, от около 0,05 до около 2,5 г/сутки. В некоторых случаях, уровни дозирования ниже низшего предела указанного выше интервала могут быть более чем адекватными, а в других вариантах, большие дозы могут применяться без причинения вредного побочного эффекта - например, делением таких больших доз на несколько меньших доз для введения в течение дня.

В выбранных вариантах, соединение формулы (I) или (II) или фармацевтически приемлемую соль вводят одной дозой. Обычно такое введение осуществляют инъекцией, например, внутривенной инъекцией, для быстрого введения агентов. Однако другие пути могут применяться при необходимости. Однократная доза соединения формулы (I) или (II) или фармацевтически приемлемая соль также могут при-

меняться для лечения острого состояния.

В выбранных вариантах, соединение формулы (I) или (II) или фармацевтически приемлемую соль вводят несколькими дозами. Введение может проводиться один, два, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз или более шести раз в сутки. Введение может осуществляться один раз в месяц, каждые две недели, раз в неделю или через день. В других вариантах, соединение формулы (I) или (II) или фармацевтически приемлемую соль вводят от около одного раза в сутки до около 6 раз в сутки. В другом варианте, введение соединения формулы (I) или (II) продолжают в течение менее около

7 дней. В еще одном варианте, введение продолжают в течение более около 6, 10, 14, 28 дней, двух месяцев, шести месяцев или одного года. В некоторых случаях, непрерывное введение достигается и сохраняется так долго, как необходимо.

Введение агентов в соответствии с данным изобретением может продолжаться так долго, как необходимо. В выбранных вариантах, соединение формулы (I) или (II) или фармацевтически приемлемую соль вводят в течение более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 или 28 дней.

В некоторых вариантах, соединение формулы (I) или (II) или

фармацевтически приемлемую соль вводят в течение менее 28, 14, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 дня. В выбранных вариантах, соединение формулы (I) или (II) или фармацевтически приемлемую соль вводят в течение хронически или постоянно - например, для лечения хронических эффектов.

Эффективное количество сочетания соединения формулы (I) или (II) или фармацевтически приемлемой соли может вводиться одной или несколькими дозами любым из приемлемых способов введения агентов, имеющих похожее применение, включая ректальный, буккальный, интраназальный и чрезкожный пути, интраартериальной инъекцией, внутривенно, внутрибрюшинно, парентерально, внутримышечно, подкожно, перорально, местно или ингаляцией.

На основе исследований *in vitro*, акалабрутиниб

преимущественно метаболизируется ферментами CYP3A, и в меньшей степени, глутатионовым конъюгированием и амидным гидролизом. Соединение формулы (I) идентифицируют как основной метаболит в плазме со средним геометрическим контактом (ППК) приблизительно в 2-3-раза выше, чем контакт акалабрутиниба. Основной метаболит на приблизительно 50% менее мощный, чем акалабрутиниб по отношению к ингибированию ТКБ в биохимическом анализе.

Акалабрутиниб и основной метаболит образует ковалентную связь с цистеиновым остатком в ТКБ активном сайте, что приводит к ингибированию ферментной активности ТКБ. Связывание Акалабрутиниба с цистеиновым остатком происходит быстро и необратимо и обеспечивает высокую занятость цели в устойчивом состоянии. Основываясь на клинических исследованиях, где субъекты получали однократную пероральную дозу 100 мг акалабрутиниба, средний период полувыведения ($t_{1/2}$)

акалабрутиниба и основного метаболита составляет 0,9 (интервал: 0,6-2,8) часа и 6,9 часов, соответственно. Средний кажущийся общий клиренс Акалабрутиниба (CL/F) составляет 159 л/ч с похожей фармакокинетикой среди пациентов и здоровых субъектов на основе фармакокинетического анализа у населения.

Возможно, что более медленно выводимый основной метаболит, который доступен в течение более длительного периода времени по мере снижения уровня быстро очищаемого акалабрутиниба в сыворотке, обеспечивает дополнительную выгоду за счет ингибирования вновь синтезированного фермента ТКБ и поддержания более высокого уровня эффективной занятости мишени ТКБ в течение интервала дозирования.

Акалабрутиниб является слабым ингибитором CYP3A4/5, CYP2C8 и CYP2C9, но не ингибирует CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19 и CYP2D6. Он является слабым индуктором CYP1A2, CYP2B6 и CYP3A4. Основной метаболит является слабым ингибитором CYP2C8, CYP2C9 и CYP2C19, но не ингибирует CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6 и CYP3A4/5. Он является слабым индуктором CYP3A4.

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ

В одном варианте, изобретение относится к способу лечения ТКБ-медирированного расстройства у млекопитающего, который включает введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах, изобретение относится к способу лечения гиперпролиферативного расстройства, воспалительного расстройства, иммунного расстройства или аутоиммунного

расстройства у млекопитающего, который включает введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах, изобретение относится к способу лечения, соединением формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой солью, гиперпролиферативного

расстройства у млекопитающего, выбранного из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака головы и шеи, протоковой аденокарциномы поджелудочной железы (ПАПЖ), рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, карциномы молочной железы, рака молочной железы, фибросаркомы, мезотелиомы, почечно-клеточного рака, рака легкого, тимомы, рака предстательной железы, рака прямой и ободочной кишки, рака яичников, острого миелоидного лейкоза, рака тимуса, рака головного мозга, пло-

скоклеточного рака, рака кожи, рака глаз, ретинобластомы, меланомы, внутриглазной меланомы, рака полости рта и ротоглотки, рака ЖКТ,

рака желудка, рака шейки матки, рака головы, шеи, почек, рака почки, рака печени, рака яичников, рака простаты, рака толстой кишки, рака пищевода, рака яичка, гинекологического рака, рака щитовидной железы, рака, связанного с синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД) (например, лимфомы и саркомы Капоши), вирусного рака, глиобластомы, опухолей пищевода,

гематологических новообразований, первичной лимфомы центральной нервной системы, немелкоклеточного рака легких (НМКРЛ), хронического миелоцитарного лейкоза, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВКЛ), опухоли пищевода, лимфомы центра клеток фолликула, опухоли головы и шеи, вирусного гепатита С, гепатоцеллюлярной карциномы, болезни Ходжкина, метастатического рака толстой кишки, множественной миеломы, неходжкинской лимфомы, опухоли яичника, опухоли поджелудочной железы, почечно-клеточного рака, мелкоклеточного рака легкого или меланомы IV стадии. В выбранных вариантах, изобретение относится к способу лечения ингибитором ТКБ расстройств, таких как

гиперпролиферативное расстройство, включая, но не ограничиваясь ими, рак, такой как острый миелоидный лейкоз, рак тимуса, мозга, легкого, плоскоклеточный рак, рака кожи, глаз, ретинобластомы, внутриглазную меланому, рак ротовой полости и ротоглотки, мочевого пузыря, ЖКТ, желудка, поджелудочной железы, мочевого пузыря, молочной железы, шейки матки, головы, шеи, почек, печени, яичников, простаты, прямой и ободочной кишки, пищевода, яичек, гинекологический рак, рак щитовидной железы, ЦНС, ПНС, связанный со СПИД (например, лимфома и саркома Капоши) или вирусный рак. В некоторых вариантах, указанная фармацевтическая композиция предназначена для лечения не ракового

гиперпролиферативного расстройства, такого как доброкачественная гиперплазия кожи (например, псориаз), ретенноз или простаты (например, доброкачественная гиперплазия предстательной железы (ДГПЖ)). В конкретных вариантах, способ лечения

гиперпролиферативного расстройства включает введение

млекопитающему соединения в соответствии с данным изобретением (например, соединения формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой соли). В одном варианте, соединение

формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль напрямую вводят млекопитающему, но не вводят млекопитающему одновременно с другим ингибитором ТКБ. В одном варианте, соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль напрямую вводят млекопитающему, но не вводят млекопитающему одновременно с акалабрутинибом. В одном варианте, соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемая соль является единственным ингибитором ТКБ, непосредственно вводимым млекопитающему.

В некоторых вариантах, изобретение относится к способу лечения воспалительного, иммунного или аутоиммунного

расстройства у млекопитающих соединением формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой солью. В частных вариантах соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль вводят непосредственно млекопитающему. В одном варианте, соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль вводят непосредственно

млекопитающему, но не вводят млекопитающему одновременно с другим ингибитором ТКБ. В одном варианте, соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль вводят непосредственно млекопитающему, но не вводят млекопитающему одновременно с акалабрутинибом. В одном варианте, соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемая соль является единственным ингибитором ТКБ, непосредственно вводимым млекопитающему. В выбранных вариантах, изобретение также относится к способу лечения заболевания соединением формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой соли, где заболевание выбирают из группы, состоящей из ангиогенеза опухоли, хронического воспалительного заболевания, ревматоидного артрита, атеросклероза, воспалительного заболевания кишечника, заболеваний кожи, таких как псориаз, экзема и склеродерма, диабета 1 типа, диабета 2 типа, диабетической ретинопатии, ретинопатии недоношенных, возрастной макулярной дегенерации, гемангиомы, глиомы и меланомы, язвенного колита, atopического дерматита, паучита, спондилоартрита, увеита, болезни Бехчета, ревматической полимиалгии, гигантоклеточного артериита,

саркоидоза, болезни Кавасаки, ювенильного идиопатического артрита, гнойного гидраденита, синдрома Сьоргена, псориазного артрита, ювенильного ревматоидного артрита, анкилозирующего спондилита, болезни Крона, волчанки, волчаночного нефрита, заболеваний, связанных с человеческим лейкоцитарным антигеном

(ЧЛИА), аутоантител, иммунотерапии, болезни Аддисона,

аутоиммунного полиэндокринного синдрома 1 типа (АПС-1), аутоиммунного полиэндокринного синдрома 2 типа (АПС-2), болезни Грейвса, тироидита Хасимото, полиэндокринного аутоиммунитета, ятрогенного аутоиммунитета, идиопатического гипопаратиреоза, витилиго и волчаночного нефрита.

"Непосредственное введение" означает, что соединение формулы

(I) или формулы (II) или фармацевтически приемлемая соль любого из них вводят пациенту непо-

средственно, а не косвенно вводят через введение молекулы предшественника. Для любого варианта, где упоминается введение соединения формулы (I) или формулы (II) или фармацевтически приемлемой соли любого из них теплокровному животному в общем смысле, представлен другой еще один вариант, где указанное соединение или соль вводят непосредственно.

В некоторых вариантах, в изобретении представлен способ лечения воспалительного, иммунного или аутоиммунного расстройства, выбранного из группы, состоящей из ревматоидного артрита (РА), ювенильного РА, ювенильного идиопатического артрита, остеоартрита, псориатического артрита, обычного псориаза, пузырчатки, буллезного пемфигоида, остеоартрита, инфекционного артрита, прогрессирующего хронического артрита, ревматической полимиалгии, деформирующего артрита, травматического артрита, подагрического артрита, синдрома Рейтера, полихондрии, острого синовита, анкилозирующего спондилита, спондилита, синдром Сьоргена (СС), системной красной волчанки (СКВ), дискоидной красной волчанки (дискоидной КВ), отежной КВ, волчаночного нефрита (ВН), антифосфолипидоза, дерматомиозита, полимиозита, аутоиммунных гематологических заболеваний, тромбоцитопении, идиопатической тромбоцитопении пурпура, тромбоцитической тромбоцитопении пурпура, аутоиммунного синдрома (холодовой) агглютинации, аутоиммунной гемолитической анемии, криоглобулинемии, апластической анемии, нейтропении, аутоиммунного васкулита, болезни Бехчета, васкулита, ассоциированного с антинейтрофильным цитоплазматическим антителом (АНЦА), склеродермии, системного склероза, миастении, рассеянного склероза (РС), хронического очагового энцефалита, синдрома Гийена-Барре, синдрома хронической усталости, непереносимости системной нагрузки, невриомиелимита зрительного нерва, аутоиммунного зуда, конъюнктивита, кератоконъюнктивита, болезни Гвейвса, ассоциированной с щитовидной железой офтальмопатии, хронического тиреоидита, гранулематоза с микроскопическим полиангиитом, гранулематоза Вегенера, аутоиммунного гастрита, аутоиммунных воспалительных заболеваний кишечника, язвенного колита, болезни Крона, болезни трансплантат против хозяина, идиопатической целиакии, аутоиммунного гепатита, активного гепатита (острого и хронического), идиопатического легочного фиброза, бронхита, легочного интерстициального фиброза, хронического воспалительного заболевания легких, саркоидоза, идиопатической мембранной нефропатии, IgA-нефропатии, гломерулосклероза, гломерулонефрита (с или без нефротического синдрома), панкреатита и диабета 1 или 2 типа.

В некоторых вариантах, в изобретении представлен способ лечения воспалительного, иммунного или аутоиммунного расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабетической ретинопатии, гигантоклеточного артериита, болезни Кавасаки, воспалительного заболевания кишечника, болезни раздраженного кишечника, идиопатической целиакии, энтеропатии, постгерпетической невралгии, ревматической полимиалгии, первичного билиарного цирроза, миастении гравис, воспалительной боли, кахексии, пародонтоза, воспаления легких, воспаления среднего уха, пневмокониоза, мононуклеоза, эмфиземы легких, легочного фиброза, силикоза, хронического воспалительного заболевания легких, хронической обструктивной болезни легких, легочной недостаточности, легочного интерстициального фиброза, болезни Уиппла, доброкачественной гиперплазии кожи (например, псориаза), миалгий, вызванных инфекциями, кахексии, вторичной по отношению к инфекции, системной непереносимости физической нагрузки, атеросклероза, гранулематоза, гранулематоза с микроскопическим полиангиитом, гнойного гидраденита, возрастной дегенерации желтого пятна и амилоидоза.

В некоторых вариантах, в изобретении представлен способ лечения воспалительного, иммунного или аутоиммунного расстройства, где воспалительным, иммунным или аутоиммунным расстройством является дерматоз, в котором ТКБ-медирированные сигналы вовлечены в привлечение, активацию и/или пролиферацию клеток и образование воспалительных медиаторов и антимикробных пептидов в коже. В некоторых вариантах в изобретении представлен способ лечения дерматоза, где дерматоз возникает из кожных проявлений системных заболеваний, где сенсбилизация, привлечение лимфоцитов, отклонение лимфоцитов антиген-представляющими клетками, местными или в лимфатических узлах, активация находящихся или возвращенных в кожу лимфоцитов, врожденного иммунного восприятия, кератиноцитных антимикробных реакций, активация резидентных или инфильтрационных миелоидных дендритных клеток, плазмацитоидных дендритных клеток, макрофагов, мастоцитов, нейтрофилов и/или клеток Лангеранса, приводит к развитию кожных поражений. В некоторых вариантах, в изобретении представлен способ лечения дерматоза, выбранного из группы, состоящей из псориаза, каплевидного псориаза, эритродермического псориаза, псориазных ногтей, кольцевидного пустулезного псориаза, пустулезного псориаза, обратного псориаза, псориазного артрита, бленноррагической кератодермии, парапсориаза, узловой эритемы, ладонно-подошвенного гидраденита, атопического дерматита, атопической экземы, себорейной экземы, себорейного дерматита, дисгидроза, розацеа, кожной красной волчанки, острой кожной красной волчанки, подострой кожной красной волчанки, дискоидной красной волчанки, отежной красной волчанки, волчаночного нефрита (ВН), красного волчаночного панникулита, эритемы, бородавки, бородавчатой красной волчанки, витилиго, гнездовой алопеции, rugo узловатого, красный плоский лишай, узловатой почесухи, красного плоского лишая, пигментной почесухи, обыкновенной пузырчатки, буллезного пемфигоида, волчаночной пузырчатки, узловатой пузырчатки, эритродермического саркоидоза, гранулематозного дерматита, склеродермии, системного склероза, кожных проявлений системного склероза, диффузного кожного мастоцитоза, эритродермического мастоцитоза, кольцевидной гранулемы,

узелкового хондродерматита, контактного дерматита, лекарственной токсидермии, линейного IgA буллезного дерматоза, эозинофильного дерматита, фолликулярного кератоза, лимфоматоидного папулеза, оспенновидного лихеноидного острого параспориоза (PLEVA), хронического лихеноидного параспориоза (PLC), лихорадочной язвенно-некротической болезни Мухи-Хабермана (FUMHD), хронической крапивницы, ревматоидного нейтрофильного дерматита, криоглобулинемической пурпуры и гиперглобулинемической пурпуры.

В некоторых вариантах, в изобретении представлен способ лечения гиперпролиферативного расстройства, где гиперпролиферативным расстройством является хроническое аутоиммунное и воспалительное расстройство костей, в котором подача сигналов ТКБ в остеокластах, мастоцитах и миелоидных клетках вовлечена в остеолиз, остеокластные процессы, дисбаланс процессов ремоделирования костной ткани или потерю плотности костей. Заболевания такой природы, которые часто также имеют аутоиммунный компонент, включают остеоартрит, потерю кости из-за метастазов, остеолитические повреждения, остеопороз, анкилозирующий спондилит, спондилоартрит, диффузный идиопатический скелетный гиперостоз, подагрический артрит и расстройство костей, связанные с множественной миеломой. В некоторых вариантах, в изобретении представлен способ лечения гиперпролиферативного расстройства, где гиперпролиферативное расстройство выбирают из группы, состоящей из остеоартрита, потери костей из-за метастазов, остеолитических поражений, остеопороза, анкилозирующего спондилита, спондилоартрита, диффузного идиопатического скелетного гиперостоза, подагрического артрита и расстройства костей, связанные с множественной миеломой.

В некоторых вариантах, в изобретении представлен способ лечения аллергических и атопических заболеваний, в которых активированные В клетки вырабатывают IgE антитела и мастоциты дегранулируют следующее вовлечение FcεR, приводящее к выделению провоспалительных факторов и острой активации местных тканевых реакций, а также хронических изменений в эндотелиальных клетках, нейро-рецепторах и других проксимальных структур, которые управляют функциями органов. Такие состояния включают атопический дерматит, контактный дерматит, экзему, атопическую экзему, обычную пузырчатку, буллезную пузырчатку, узловатую чесуху, синдром Стевенса-Джонсона, астму, гиперчувствительность дыхательных путей, бронхит, реактивную астму, хроническое обструктивное заболевание легких, гиперчувствительность 1 типа, гиперчувствительность 2 типа, аллергический ринит, аллергический конъюнктивит и другие воспалительные и обструктивные заболевания дыхательных путей. Аллергии, которые могут быть лечены или предотвращены, включают, среди прочих, аллергии на пищу, пищевые добавки, инсектициды, пылевых клещей, пыльцу, животные продукты, металлы и определенные лекарственные средства.

В одном варианте в изобретении представлен способ лечения болезни трансплантат против хозяина (БТПХ), включающий стадию введения соединения формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой соли, где БТПХ выбирают из группы, состоящей из БТПХ, ассоциированной с трансплантатом стволовых клеток, БТПХ, ассоциированной с трансплантатом костного мозга, БТПХ тимуса, БТПХ кожи, желудочно-кишечной БТПХ, БТПХ печени, острой БТПХ и хронической БТПХ. В конкретных вариантах, соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль непосредственно вводят млекопитающему. В одном варианте, соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль непосредственно вводят млекопитающему, но не вводят млекопитающему одновременно с другим ингибитором ТКБ. В одном варианте, соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль непосредственно вводят млекопитающему, но не вводят млекопитающему одновременно с акалабрутинином. В одном варианте, соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемая соль является единственным ингибитором ТКБ, вводимым непосредственно млекопитающему.

В одном варианте лекарственное средство ингибирует нейродегенеративные заболевания, которые включают активацию микроглии, привлечение и активацию макрофагов, инфильтрацию воспалительных клеток, включая миелоидные клетки, которые требуют подачи сигнала ТКБ для передачи сигналов активации, распознавание интегринов на активированных эндотелиальных клетках, экстравазат или развитие в цитокин- и/или хемокин-производящие клетки *in situ*. Ингибирование ТКБ соединением формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой солью будет ингибировать болезненную активность или развитие болезни через ингибирование нейродегенеративных болезней, ассоциированных с токсической агрегацией белка, такой как аккумуляция бета-амилоидных отложений (амилоидных бляшек), нейрофибриллярных клубков, тау агрегации и гипер-фосфорилирования, внутрицитоплазматических вирусных включений, внутрицитоплазматических парных спиральных филаментов, полигликозановых включений, телец Паппа-Лантоса, убиквитин-содержащих включений, и расстройств, при которых неадекватный контроль разложения белка и/или неспособность располагать несвернутые белки приводит к нейродегенерации. Такие заболевания включают спорадические и наследственные болезнь Альцгеймера, умеренное когнитивное ухудшение, церебральную амилоидную ангиопатию, деменцию телец Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви, синдром Дауна, болезнь Хантингтона, стрианигральную дегенерацию, множественную системную атрофию (МСА-Р, МСА-С, синдром Шая-Драгера), спорадический или наследственный амиотрофический боковой склероз (АБС или болезнь Лу Герига), первичный боко-

вой склероз, ювенильный первичный боковой склероз, нейродегенеративные таупатии, спорадические или наследственные синуклеинопатии, нейронную внутриядерную инклюзионную болезнь, болезнь Паркинсона, лобно-височную деменцию с паркинсонизмом, связанным с хромосомой 17 (FTDP-17).

В одном варианте изобретение относится к способу лечения соединением формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой солью, нейродегенеративного расстройства у млекопитающего, где ингибирование воспалительных процессов в глиальных клетках, миелиодных клетках, шванновских клетках, олигодендроцитах и других полученных из миелоида типах клеток, расположенных в ЦНС, достигается через их ковалентное взаимодействие с ТКБ и ингибирование подачи сигнала через ТКБ путь. Введение соединения формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой соли предотвратит или снизит нейродегенерацию через ингибирование иммунного распознавания и воспалительных реакций в направлении неправильно свернутых и/или аккумулированных внутриклеточных белков из-за расстройств тринуклеотидного повтора (полиглутаминовых заболеваний), болезни Хантингтона, спиноцеребеллярной атаксии типов 1, 2, 3 (болезни Мачадо-Джозефа), 6, 7 и 17; спинальной и бульбарной мышечной атрофии, дентато-рубродо-паллидо-люйсовиной атрофии, нейронного восковидного липофусциноза, лобно-височной деменции (болезни Пика, первичной прогрессирующей афазии и семантической деменции), кортико-базальной дегенерации и прогрессирующего надъядерного паралича. В конкретных вариантах соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль вводят непосредственно млекопитающему. В одном варианте, соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль непосредственно вводят млекопитающему, но не вводят млекопитающему одновременно с другим ингибитором ТКБ. В одном варианте, соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль непосредственно вводят млекопитающему, но не вводят млекопитающему одновременно с акалабрутинибом. В одном варианте, соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемая соль является единственным ингибитором ТКБ, вводимым непосредственно млекопитающему.

В другом варианте, введение соединения формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой соли может применяться для ингибирования ТКБ у млекопитающего, тем самым облегчая медиированную воспалением смерть нейронов и другие нейровоспалительные эффекты из-за спорадической или наследственной прионной болезни, прионных расстройств, таких как болезнь Крейтцфельдта-Якоба, куру, синдрома Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, и расстройств, ведущих к оливопонтocereбеллярной атрофии, спорадической фатальной бессонницы, фатальной семейной бессонницы. В случае семейных прионных расстройств, введение соединения формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой соли у млекопитающих также может применяться для профилактики и/или задержки наступления клинических проявлений болезни, в дополнение к снижению симптомов заболевания и замедления развития заболевания после наступления клинических признаков. В конкретных вариантах, соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль вводят непосредственно млекопитающему. В одном варианте соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль непосредственно вводят млекопитающему, но не вводят млекопитающему одновременно с другим ингибитором ТКБ. В одном варианте соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль непосредственно вводят млекопитающему, но не вводят млекопитающему одновременно с акалабрутинибом. В одном варианте соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемая соль является единственным ингибитором ТКБ, вводимым непосредственно млекопитающему.

В одном варианте изобретение относится к способу лечения соединением формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой соли аутоиммунно медиированного нейродегенеративного расстройства в центральной и/или периферической нервной системе. Через ингибирование ТКБ-медиированного образования антитела, соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемая соль могут снижать активацию миелоид-производных клеток, расположенных в тканях, и ингибировать транскитоз, кровоизлияние и инфильтрацию циркулирования миелиодных клеток, тем самым снижая воспаление. Кроме того, лечение соединения формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой солью может снижать активацию воспалительных процессов на эндотелиальной-микроглиальной границе и интерстициальном пространстве, где наблюдаются лимфоидные агрегаты при аутоиммунных невропатиях, через 1) изменение перекрестного диалога между микроглией и эндотелиальными клетками, 2) ингибирование активации В лимфоцитов и их презентации распознанного антигена к циркулирующим или инфильтрующим Т клеткам, и 3) снижение образования цитокина и/или хемокина. Считается, что эти эффекты ингибирования ТКБ ковалентным взаимодействием с соединением формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой солью снижают инфильтрацию аутоиммунных Т клеток в серое вещество и белое вещество, ингибированием активации В клетки, активации цитокина и функции APC, а также изменением статуса развития и взросления профессиональных APC, включая инфильтрующие моноциты, активированные микроглии и олигодендроциты. Таким образом, способ лечения медиированных аутоиммунитетом нейродегенеративных расстройств ковалентным ингибитором ТКБ, таким как соединения формулы (I) и (II), могут ухудшать развитие заболевания через ингибирование природных иммунных процессов, а также снижение образования антитела и активации аутоиммунных Т клеток. Изобретение может замедлять развитие или вызывать ремиссию экспериментальной аутоиммунной энцефалопатии в

животных моделях, и в человеческих невропатиях, включая оптикомиелит (синдром Девика), синдром Гийена-Барре, рассеянный склероз, клинически изолированный синдром, рецидивирующее-ремиттирующий рассеянный склероз, злокачественный рассеянный склероз, первичный прогрессирующий рассеянный склероз, заболевания спектра оптикомиелита, концентрический склероз Балло, болезнь Марбурга, диффузный миелинокlastный склероз, хронический очаговый энцефалит, энцефалит Расмуссена, синдром скованного человека, миастению гравис, полинейропатию, связанную с анти-MAG IgM моноклональной гаммопатией. В конкретных вариантах, соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль вводят непосредственно млекопитающему. В одном варианте, соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль непосредственно вводят млекопитающему, но не вводят млекопитающему одновременно с другим ингибитором ТКБ. В одном варианте, соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль непосредственно вводят млекопитающему, но не вводят млекопитающему одновременно с акалабрутинином. В одном варианте, соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемая соль является единственным ингибитором ТКБ, вводимым непосредственно млекопитающему.

В другом варианте изобретение относится к способу лечения соединением формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемой солью полиневропатий, возникающих при инфекционном или постинфекционном невровоспалении у млекопитающих, включая синдром Баннворта (болезнь Лайма), хронический энцефаломиелит (болезнь Лайма); постгерпетическую невралгию; HTLV-1 ассоциированную миелопатию; прогрессирующую многоочаговую лейкоэнцефалопатию; синдром хронической усталости (СХУ), системную непереносимость физической нагрузки (СНФН), миалгический энцефаломиелит (МЭ), поствирусный синдром усталости (ПВСУ), синдром хронической усталости и иммунной дисфункции (СХУМД); болезнь Меньера (головокружение- регуляция эндолимфы жидкости внутреннего уха), синдром Гийена-Барре, амиотрофический боковой склероз, прогрессирующий бульбарный паралич, детский прогрессирующий бульбарный паралич (или юношеский прогрессирующий бульбарный паралич), паралич Белла, вестибулярный неврит, острый рассеянный энцефаломиелит, рецидивирующий или многофазный рассеянный энцефаломиелит и хронический энцефаломиелит. В конкретных вариантах соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль вводят непосредственно млекопитающему. В одном варианте соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль непосредственно вводят млекопитающему, но не вводят млекопитающему одновременно с другим ингибитором ТКБ. В одном варианте соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль непосредственно вводят млекопитающему, но не вводят млекопитающему одновременно с акалабрутинином. В одном варианте соединение формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемая соль является единственным ингибитором ТКБ, вводимым непосредственно млекопитающему.

В некоторых вариантах гиперпролиферативным расстройством является солидная опухоль, выбранная из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы, рака головы и шеи, протоковой аденокарциномы поджелудочной железы (ПАПЖ), рака поджелудочной железы, карциномы толстой кишки, карциномы молочной железы, рака молочной железы, фибросаркомы, мезотелиомы, почечно-клеточной карциномы, карциномы легких, тимомы, рака простаты, рака прямой и ободочной кишки, рака яичников, острого миелоидного лейкоза, рака тимуса, рака мозга, плоскоклеточного рака, рака кожи, рака глаза, ретинобластомы, меланомы, внутриглазной меланомы, рака ротовой полости, рака ротоглотки, рака ЖКТ, рака желудка, рака шейки матки, рака почек, рака печени, рака яичников, рака простаты, рака прямой и ободочной кишки, рака пищевода, рака яичек, гинекологического рака, рака щитовидной железы, раков, связанных с синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД) (например, лимфомы и саркомы Капоши), вирусных раков, таких как карцинома шейки матки (папилломавирус человека), В-клеточной лимфопротлиферативной болезни, карциномы носоглотки (вируса Эпштейна-Барр), саркомы Капоши и лимфом полостей тела (герпесвируса саркомы Капоши), печеночно-клеточной карциномы (вирусов гепатита В и гепатита С) и Т-клеточных лейкозов (вирус-1 человеческого Т-клеточного лейкоза), глиобластомы, опухолей пищевода, опухоли головы и шеи, метастатического рака толстой кишки, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака яичников, рака поджелудочной железы, почечно-клеточной карциномы, гематологических новообразований, мелкоклеточного рака легких, не мелкоклеточного рака легких, меланомы IV стадии и глиомы.

В некоторых вариантах, гиперпролиферативным расстройством является В-клеточный гемобластоз, выбранный из группы, включающей хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточный лимфоцитарный лейкоз (МЛЛ), неходжкинская лимфома (НХЛ), диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВКЛ), фолликулярная лимфома (ФЛ), мантийноклеточная лимфома (МКЛ), лимфома Ходжкина, В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), лимфома Буркитта, макроглобулинемия Вальденстрема (МВ), лимфома Буркитта, множественная миелома, миелодиспластические синдромы или миелофиброз. В одном варианте, изобретение относится к способу лечения рака у млекопитающего, где раком является хронический миелоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, ДВКЛ (включая активированный В-клеточный (АВС) и зародышевый центр В-клеточный (GCB) подтипы), лимфома фолликулярного центра, болезнь Ходжкина, множественная миелома, нечувствительная неходжкинская лимфома и ОЛЛ зрелых В-клеток.

В некоторых вариантах гиперпролиферативным заболеванием является подтип ХЛЛ. Множество подтипов ХЛЛ было охарактеризовано. ХЛЛ часто классифицируют по мутационному статусу вариабельно области тяжелой цепи иммуноглобулина (IgV_H) в лейкозных клетках. R. N. Damle, et al., Blood 1999,94, 1840-47; T. J. Hamblin et al., Blood 1999, 94, 1848-54. Пациенты с IgV_H мутациями в общем выживают дольше, чем пациенты без IgV_H мутаций. Экспрессию ZAP70 (положительную или отрицательную) также применяют для характеристики ХЛЛ. L. Z. Rassenti et al., N. Engl. J. Med. 2004,351, 893-901. Метилирование ZAP-70 на CpG3 также применяют для характеристики ХЛЛ, например, через пиросеквенирование. R. Claus et al., J. Clin. Oncol. 2012,30, 2483-91; J. A. Woyach, et al., Blood 2014,123, 1810-17. ХЛЛ также классифицируют по стадии заболевания по критерию Бине или Раи. J. L. Binet, et al., Cancer 1977,40, 855-64; K. R. Rai, T. Han, Hematol. Oncol. Clin. North Am. 1990,4, 447-56. Другие общие мутации, такие как делеция 11q, делеция 13q и делеция 17p могут быть оценены с применением хорошо известных методик, таких как флуоресценция *in situ* гибридизации (FISH). В одном варианте, изобретение относится к способу лечения ХЛЛ у человека, где ХЛЛ выбирают из группы, включающей отрицательный ХЛЛ с IgV_H мутацией, ZAP-70 положительный ХЛЛ, ZAP-70 метилированный на CpG3 ХЛЛ, CD38 положительный ХЛЛ, хронический лимфоцитный лейкоз, характеризуемый 17p13.1 (17p) делецией и ХЛЛ, характеризуемый 11q22.3 (11q) делецией.

В некоторых вариантах гиперпролиферативным расстройством является ХЛЛ, где ХЛЛ перенес трансформацию Рихтера. Способы оценки трансформации Рихтера, которое также известно как синдром Рихтера, описаны у P. Jain and S. O'Brien, Oncology, 2012,26, 1146-52. Трансформация Рихтера является подтипом ХЛЛ, который наблюдается у 5-10% пациентов. Она включает развитие агрессивной лимфомы из ХЛЛ и имеет обычно плохой прогноз.

В некоторых вариантах гиперпролиферативным расстройством является ХЛЛ или МЛЛ у пациента, где пациент чувствителен к лимфоцитозу. В одном варианте изобретение относится к способу лечения ХЛЛ или МЛЛ у пациента, где пациент демонстрирует лимфоцитоз, вызванный расстройством, выбранным из группы, состоящей из вирусной инфекции, бактериальной инфекции, протозойной инфекции или пост-спленэктомического состояния. В одном варианте вирусную инфекцию в любом из представленных выше вариантов выбирают из группы, состоящей из инфекционного мононуклеоза, гепатита и цитомегаловируса. В одном варианте бактериальную инфекцию в любом из представленных выше вариантов выбирают из группы, состоящей из кашля, туберкулеза и бруцеллеза.

В некоторых вариантах гиперпролиферативное расстройство выбирают из группы, состоящей из миелолифолиферативных расстройств (МЛП), миелолифолиферативных новообразований, истинной полицитемии (ИП), эссенциальной тромбоцитемии (ЭТ), первичного миелофиброза (ПМФ), миелодиспластического синдрома, хронического миелогенного лейкоза (BCR-ABL1-положительного), хронического нейтрофильного лейкоза, хронического эозинофильного лейкоза или мастоцитоза.

В одном варианте представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, или соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемая соль, для применения в терапии.

В одном варианте представлено применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли, или соединения формулы (II) или его фармацевтически приемлемой соли, в производстве лекарственного средства.

В одном варианте представлено применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли, или соединения формулы (II) или его фармацевтически приемлемой соли, в производстве лекарственного средства, где лекарственное средство производят *ex-vivo*.

В любом варианте, где производство лекарственного средства указано в общем смысле, существует другой вариант, где лекарственное средство производят *ex-vivo*.

В одном варианте представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, или соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемая соль, для применения в лечении гиперпролиферативного расстройства, воспалительного расстройства, иммунного расстройства или аутоиммунного расстройства у млекопитающего.

В одном варианте представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении заболевания, медиированного ТКБ, где заболеванием является гиперпролиферативное заболевание. Гиперпролиферативным заболеванием может быть любое гиперпролиферативное заболевание, указанное здесь.

Примеры

Рассматриваемые здесь варианты далее описаны со ссылками на следующие примеры. Эти примеры приведены только с целью иллюстрации, и рассматриваемое здесь описание никоим образом не должно истолковываться как ограниченное этими примерами, а скорее должно толковаться как охватывающее любые и все варианты, которые становятся очевидными в результате представленных здесь идей. Реагенты, описанные в этих примерах, коммерчески доступны или могут быть получены по методикам, описанным в литературе.

Пример 1. Аналитические методы

Представленные ниже методы жидкостной хроматографии (ЖХ) и масс спектрометрии (МС) могут

применяться для характеристики соединений, включенных в данное изобретение.

Метод А.

ЖХ-МС спектрометр (Agilent)

Датчик: DAD (210, 254 и 280 нм)

Масс датчик: API-ES (10-2000 аем, пол./отр. режим ионизации)

Элюенты (подвижная фаза):

А: 0,1% муравьиной кислоты в MilliQ-воде,

В: ацетонитрил

Колонка: Waters XTerra C18 MS, 50×4,6 мм ВД, 2,5 мкм

Скорость потока: 0,5 мл/мин

Программа градиента элюирования:

Время (мин)	А (%)	В (%)
0,0	90	10
7,0	10	90
7,1	0	100
10,0	90	10

Метод В:

ВЭЖХ: аналитическая ВЭЖХ система Gilson

Колонка: Phenomenex Luna C18(2) (100×2,00 мм, 5 мкм)

Датчик: UV/Vis (210/240 нм)

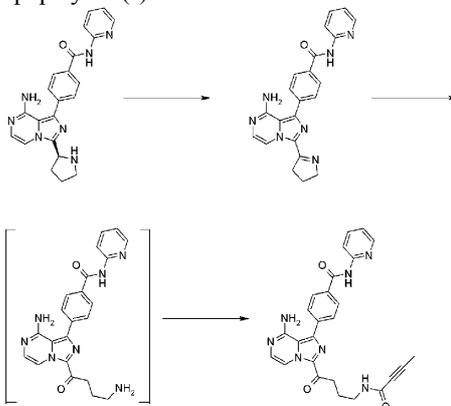
Скорость потока: 1 мл/мин

Элюенты (подвижная фаза): А: ацетонитрил, В: ацетонитрил/MilliQ-вода=1/9 (об./об.), С: 0,1% ТФК в MilliQ-воде.

Программа градиента элюирования:

Время (мин)	А (%)	В (%)	С (%)
0,0	0	97	3
11,90	97	0	3
14,40	97	0	3
15,40	0	97	3

Пример 2. Синтез соединения формулы (I)



Получение 4-[8-амино-3-(пирролидин-2-ил)имидазо[1,5-а]пиазин-1-ил]-N-пиридин-2-илбензамида.

Это соединение по существу получают способами, описанными в WO 2013/010868.

Получение 4-[8-амино-3-(3,4-дигидро-2Н-пиррол-5-ил)имидазо[1,5-а]пиазин-1-ил]-N-пиридин-2-илбензамида.

4-[8-амино-3-[(2S)-пирролидин-2-ил]имидазо[1,5-а]пиазин-1-ил]-N-(2-пиридил)бензамид (1,13 г, 2,83 ммоль) суспендируют в ДХМ (50 мл). Добавляют N-хлорсукцинимид (416 мг, 3,11 ммоль) и смесь перемешивают при 21°C. Через 10 мин реакционная смесь превращается в прозрачный бледно-желтый раствор. Добавляют триэтиламин (868 мкл, 6,23 ммоль) и смесь продолжают перемешивать при 21°C. Через 15 мин перемешивания образуется белый осадок. Осадок собирают на фильтр, промывают ацетонитрилом (20 мл) и сушат на воздухе. Это дает указанное в заголовке соединение в виде белого вещества (800 мг, 70%). МС (ИЭР+) m/z 398,2 (M+H)⁺;

¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆, 300К): δ=7,72 (1H, д, J=5,0 Гц), 6,98 (1H, д, J=5,0 Гц), 4,45 (1H, т, J=6,9 Гц), 2,99 (1H, шс), 2,77-2,90 (2H, м), 2,09-2,20 (1H, м), 1,99-2,09 (1H, м), 1,78-1,89 (1H, м), 1,66-1,78 (1H, м).

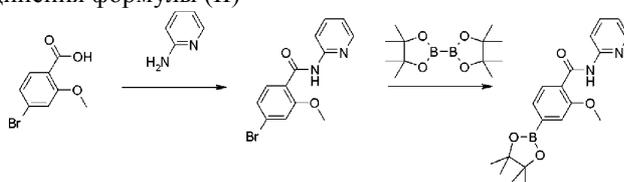
Получение 4-(8-амино-3-(4-(бут-2-инамидо)бутаноил)имидазо[1,5-а]пиазин-1-ил)-N-(пиридин-2-ил)бензамида.

4-[8-амино-3-(3,4-дигидро-2Н-пиррол-5-ил)имидазо[1,5-а]пиазин-1-ил]-N-(2-пиридил)бензамид

(167 мг, 1,69 ммоль) диспергируют в метаноле (26,8 мл). При перемешивании добавляют концентрированную хлористоводородную кислоту (12 М, 670 мкл, 8,04 ммоль). Через 30 мин образуется белый осадок. Весь растворитель выпаривают, промывают толуолом (10 мл) и снова выпаривают. Полученное белое твердое вещество диспергируют в ацетоне (70 мл) и добавляют триэтиламин (705 мкл, 5,06 ммоль). Раствор бутионилхлорида (207,4 мг, 2,02 ммоль) в ацетоне (2 мл) добавляют по каплям и белое твердое вещество постепенно растворяют. Летучие вещества удаляют в вакууме, и остаток помещают в хлороформ (200 мл), промывают водой (200 мл) и насыщенным раствором соли. Водные фазы экстрагируют хлороформом (2×50 мл). Объединенные органические слои промывают насыщенным раствором соли, сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют роторным испарением с получением 657 мг бледно-желтого твердого вещества. Неочищенный продукт очищают с применением хроматографии на силикагеле (90 г), элюируя 2-5% MeOH (содержащим 10% гидроксида аммония) в ДХМ. Чистые фракции продукта объединяют и концентрируют в вакууме с получением 228 мг (27%) бледно-желтого твердого вещества. ЖХ-МС (способ А) Ву: 3,76 мин; m/z 482,1 (M+H)⁺; ВЭЖХ (способ В) Ву: 5,79 мин; чистота 99,8%;

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆, 300К): δ=10,91 (1H, с), 8,72 (1H, д, J=4,8 Гц), 8,54 (1H, т, J=6,0 Гц), 8,42 (1H, д, J=4,9 Гц), 8,22 (3H, т, J=8,5 Гц), 7,87 (1H, дт, J1=1,9 Гц), 7,82 (2H, д, J=8,5 Гц), 7,51 (1H, д, J=4,8 Гц), 7,19 (1H, дд, J1 = 0,9 Гц, J2=4,8 Гц), 6,47 (2H, с), 3,11-3,26 (4H, м), 1,93 (3H, с), 1,83 (2H, м).

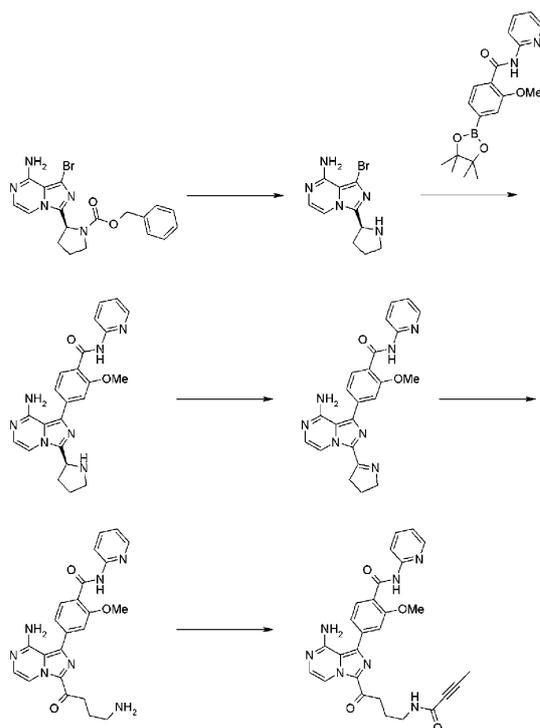
Пример 3. Синтез соединения формулы (II)



К раствору 4-бром-2-метоксибензойной кислоты (15,3 г, 66,2 ммоль) в дихлорметане (250 мл) добавляют пиридин-2-амин (6,9 г, 72,8 ммоль) и ДИПЭА (34,6 мл, 198,7 ммоль). Добавляют ГАТУ (32,7 г, 86,1 ммоль), и смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Добавляют воду (200 мл), и реакционную смесь перемешивают в течение 1 ч. Органический слой концентрируют при пониженном давлении. Добавляют ДХМ (50 мл) и раствор кристаллизуют в течение выходных. Твердые вещества отфильтровывают, дважды промывают диэтиловым эфиром (10 мл) и сушат при пониженном давлении с получением 4-бromo-2-метокси-N-(2-пиридил)бензамида (14,4 г, 66,8%) в виде светлокоричневых кристаллов. ЖХ-МС (способ А) Ву: 6,05 мин; m/z 307,0+309,0 (1:1) (M+H)⁺.

К раствору 4-бром-2-метокси-N-(2-пиридил)бензамида (14,4 г, 46,9 ммоль) в 1,4-диоксане (175 мл) добавляют бис(пинаколато)диборон (14,3 г, 56,3 ммоль) и ацетат калия (9,2 г, 93,8 ммоль). Добавляют PdCl₂(dppf).ДХМ (1,9 г, 2,3 ммоль) и смесь перемешивают при 100°C в течение 5 ч. Реакционную смесь разбавляют водой (150 мл) и дважды экстрагируют этилацетатом (150 мл). Объединенные органические слои сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют при пониженном давлении. Остаток очищают флэш-хроматографией на колонке (0-50% этилацетат в гептане). Фракции, содержащие продукт, концентрируют при пониженном давлении. Остаток суспендируют в гептане (150 мл) и перемешивают в течение 30 мин. Твердые вещества отфильтровывают и дважды промывают гептаном (15 мл) с получением 2-метокси-N-(2-пиридил)-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)бензамида (10,4 г, 62,6%) в виде белого твердого вещества. ЖХ-МС (способ А) Ву: 6,86 мин; m/z 355,2 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆, 300 К): δ=10,51 (1H, с), 8,36 (1H, м), 8,26 (1H, д, J=8,4 Гц), 7,89 (1H, д, J=7,6 Гц), 7,85 (1H, м), 7,41 (1H, дд, J1=7,6 Гц, J2=0,9 Гц), 7,38 (1H, с), 7,17 (1H, м), 4,01 (3H, с), 1,33 (12H, с).



Получение 1-бром-3-[(2S)-пирролидин-2-ил]имидазо[1,5-а]пиазин-8-амина.

В 2000 мл круглодонную колбу, оборудованную магнитной мешалкой, загружают 37% хлороводород (660 мл, 7971 ммоль). Бензил (2S)-2-(8-амино-1-бром-имидазо[1,5-а]пиазин-3-ил)пирролидин-1-карбоксилат серной кислоты (205 г, 399 ммоль) добавляют порциями (прибл. 30 мин), и реакционную смесь перемешивают в течение 8 ч при 50°C. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры в течение более 8 ч. Реакционную смесь промывают МТБЭ (3×1200 мл). 33% гидроксид натрия в воде (~600 мл) добавляют по каплям в водную фазу до достижения pH прибл. 14, сохраняя температуру 20-30°C (появляются слои МТБЭ). После добавления водную фазу перемешивают в течение 1 ч и экстрагируют дихлорметаном (2×1500 мл). Активированный уголь (10 г) добавляют к объединенным слоям ДХМ и смесь перемешивают в течение 1 ч при 40°C. Твердые вещества удаляют фильтрацией над дикалитом, и фильтрат концентрируют при пониженном давлении с получением 1-бром-3-[(2S)-пирролидин-2-ил]имидазо[1,5-а]пиазин-8-амина (112,3 г, 397,9 ммоль, 99,8% выход) в виде беловатого твердого вещества. ЖХ-МС (способ А) Ву: 0,673 мин; m/z 282,0+284,0 (1:1) (M+H)⁺;

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆, 300K): δ=7,72 (1H, д, J=5,0 Гц), 6,98 (1H, д, J=5,0 Гц), 4,45 (1H, т, J=6,9 Гц), 2,99 (1H, шс), 2,77-2,90 (2H, м), 2,09-2,20 (1H, м), 1,99-2,09 (1H, м), 1,78-1,89 (1H, м), 1,66-1,78 (1H, м).

Получение 4-[8-амино-3-[(2S)пирролидин-2-ил]имидазо[1,5-а]пиазин-1-ил]-2-метокси-N-(2-пиридил)бензамида.

1-Бром-3-[(2S)пирролидин-2-ил]имидазо[1,5-а]пиазин-8-амин (112,3 г, 398,03 ммоль), 2-метокси-N-(2-пиридил)-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)бензамид (148,04 г, 417,93 ммоль) и йодид калия (19,82 г, 119,41 ммоль) загружают в трехгорлую 3 л колбу. Добавляют 2-бутанол (550 мл) и воду (880 мл) и полученную суспензию перемешивают при барботировании газообразного азота. Добавляют триэтиламин (165,97 мл, 1194,1 ммоль) и суспензию медленно растворяют. Добавляют бис(трет-бутилдициклогексилфосфин)дихлор палладий(II) (Pd-166, 1,37 г, 1,99 ммоль), и реакционную смесь снова восстанавливают в течение 10 мин и перемешивают при 82°C в течение ночи с получением рыжеватокоричневой суспензии. Реакционную смесь охлаждают при комнатной температуре. Смесь затем нагревают до 40°C и добавляют воду (1800 мл), и после добавления снова охлаждают до комнатной температуры. Смесь фильтруют, и лепешку промывают водой (500 мл) и гептаном (300 мл). Твердое вещество суспендируют в гептане (500 мл) и совместно выпаривают. Твердое вещество снова совместно выпаривают с гептаном (500 мл) и сушат при пониженном давлении при 50°C в течение ночи с получением 4-[8-амино-3-[(2S)пирролидин-2-ил]имидазо[1,5-а]пиазин-1-ил]-2-метокси-N-(2-пиридил)бензамида (142,11 г, 330,9 ммоль, 83,1% выход) в виде светло-желтого твердого вещества. ЖХ-МС (способ А) Ву: 2,885 мин; m/z 430,1 (M+H)⁺; ВЭЖХ (способ В) Ву: 1,483 мин; чистота 98,1%;

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆, 300K): δ=10,49 (1H, с), 8,37 (1H, м), 8,30 (1H, д, J=8,3 Гц), 8,04 (1H, д, J=8,0 Гц), 7,87 (1H, дт, J₁=1,9 Гц, J₂=7,8 Гц), 7,79 (1H, д, J=5,0 Гц), 7,43 (1H, с), 7,39 (1H, дд, J₁=1,4 Гц, J₂=8,0 Гц), 7,18 (1H, дд, J₁=1,0 Гц, J₂=8,0 Гц), 7,09 (1H, д, J=4,9 Гц), 6,20 (2H, с), 4,55 (1H, т, J=7,5 Гц), 4,07 (3H, с), 2,90 (2H, т, J=7,2 Гц), 2,25 (1H, м), 2,12 (1H, м), 1,89 (1H, м), 1,78 (1H, м).

Получение 4-[8-амино-3-(3,4-дигидро-2Н-пиррол-5-ил)имидазо[1,5-а]пиазин-1-ил]-2-метокси-N-(2-пиридил)бензамида.

4-[8-амино-3-[(2S)-пирролидин-2-ил]имидазо[1,5-а]пиазин-1-ил]-2-метокси-N-(2-пиридил)бензамид (250 мг, 0,58 ммоль) берут и частично растворяют в ДХМ (20 мл). Добавляют N-хлорсукцинимид (85,1 мг, 0,64 ммоль) и смесь перемешивают при 21°C. Через 10 мин реакционная смесь превращается в прозрачный желтый раствор. Добавляют триэтиламин (177,1 мкл, 1,27 ммоль) и смесь продолжают перемешивать при 21°C. Через 30 мин перемешивания образуется осадок. Осадок выделяют с применением центрифуги с получением указанного в заголовке соединения в виде беловатого твердого вещества (187,7 мг, 75,8%). ВЭЖХ (хлорное промежуточное соединение) (способ В) Ву: 5,596 мин.

Получение тригидрохлорида 4-[8-амино-3-(4-аминобутаноил)имидазо[1,5-а]пиазин-1-ил]-2-метокси-N-(2-пиридил)бензамида.

4-[8-амино-3-(3,4-дигидро-2Н-пиррол-5-ил)имидазо[1,5-а]пиазин-1-ил]-2-метокси-N-(2-пиридил)бензамид (187,7 мг, 0,44 ммоль) помещают в метанол (8 мл). Добавляют концентрированную хлористоводородную кислоту (174,5 мкл, 2,09 ммоль). Смесь перемешивают в течение 1,5 ч. Твердое вещество получают фильтрацией с получением указанного в заголовке соединения в виде светло-желтого твердого вещества с количественным выходом (269 мг). ВЭЖХ (способ В) Ву: 3,790 мин.

Получение 4-(8-амино-3-(4-(бут-2-инамидо)бутаноил)имидазо[1,5-а]пиазин-1-ил)-2-метокси-N-(пиридин-2-ил)бензамида.

Тригидрохлорид 4-[8-амино-3-(4-аминобутаноил)имидазо[1,5-а]пиазин-1-ил]-2-метокси-N-(2-пиридил)бензамида (250 мг, 0,451 ммоль) суспендируют в ДХМ (14 мл) с ацетоном (2 мл). Добавляют ГАТУ (289,7 мг, 0,762 ммоль), триэтиламин (254,7 мкл, 1,833 ммоль) и 2-бутиновую кислоту (64,1 мг, 0,762 ммоль). Смесь перемешивают в течение ночи при 21°C. Реакционную смесь концентрируют в вакууме. Неочищенный продукт очищают с применением флэш-хроматографии (0-7% метанол в ДХМ). Фракции продукта объединяют и концентрируют в вакууме. Остаток суспендируют в метаноле (2 мл), и растворитель удаляют с применением центрифуги. Твердые вещества промывают диэтиловым эфиром (2 мл) и сушат в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде беловатого твердого вещества (76,2 мг, 33,1%). ЖХ-МС (способ А) Ву: 4,300 мин; m/z 512,2 (M+H)⁺; ВЭЖХ (способ В) Ву: 6,499 мин; чистота 98,8%;

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆, 300K): δ=10,51 (1H, с), 8,73 (1H, д, J=4,8 Гц), 8,55 (1H, т, J=6,3 Гц), 8,38 (1H, м), 8,30 (1H, д, J=8,5 Гц), 8,06 (1H, д, J=7,9 Гц), 7,88 (1H, дт, J₁=1,9 Гц, J₂=4,3 Гц), 7,52 (1H, д, J=4,8 Гц), 7,50 (1H, д, J=1,3 Гц), 7,44 (1H, дд, J₁=1,5 Гц, J₂=8,0 Гц), 7,19 (1H, м), 6,55 (2H, с), 4,08 (3H, с), 3,20 (2H, т, J=7,2 Гц), 3,16 (2H, кв, J=6,0 Гц), 1,93 (3H, с), 1,83 (2H, т, J=7,9 Гц).

Пример 4. Измерение киназной активности ТКБ и других киназ с цистеином в том же положении, как Cys481 в ТКБ

Таблица 1

Киназа	Метод	Формула I	Формула II
		IC ₅₀ (нМ)	IC ₅₀ (нМ)
ТКБ	ИМАР	5,0±1,0	9,3
ТЕС	LanthaScreen	345±34	
ITK	ИМАР	>10000	>10000
ТХК	Z'-LYTE	567±174	59
ВМХ	Z'-LYTE	15±2	
EGFFR	Z'-LYTE	>10000	
ERBB2	Z'-LYTE	552±166	
ERBB4	Z'-LYTE	343±23	
BLK	Z'-LYTE	6170±3348	
JAK3	Z'-LYTE	>10000	

Ферментную активность ТКБ измеряют с применением ИМАР (флуоресцентной поляризацией на основе иммобилизованных аффинных ионов металла) анализа как описано ниже.

Фермент ТКБ (His-ТКБ (Millipore каталожный № 14-552)) разводят до 0,4 Ед/мл в KR буфере (10 мМ Tris-HCl, 10 мМ MgCl₂, 0,01% Tween-20, 0,05% NaN₃, 1 мМ ДТТ, 2 мМ MnCl₂, pH 7,2).

Серийные разведения log₁₀ от 2 мМ до 63,2 нМ тестируемых соединений получают в 100% ДМСО. Разведения в ДМСО затем разводят 50-кратной в KR-буфере. Конечный интервал концентрации соединения в анализе составляет от 10 мкМ до 0,316 нМ.

Анализ проводят следующим образом: 5 мкл/лунку тестируемого соединения в KR буфере (конечная концентрация ДМСО в анализе составляет 1%) смешивают с 5 мкл/лунку 0,4 Ед/мл ТКБ фермента

(конечная концентрация в анализе составляет 0,1 Ед/мл). Тестируемое соединение и ТКБ фермент предварительно инкубируют в течение 60 мин при комнатной температуре, затем добавляют 5 мкл/лунку 200 нМ Fluorescein-меченного субстратного пептида (субстрат Blk/Lyntide, например, #R7188/#R7233, Molecular Devices) в KR-буфере. Конечная концентрация пептидного субстрата в анализе составляет 50 нМ. Киназный анализ начинают добавлением 5 мкл/лунку 20 мкМ АТФ в KR-буфере (конечная концентрация АТФ составляет 5 мкМ АТФ, Км АТФ в ТКБ ИМАР анализе). После инкубирования в течение 2 ч при комнатной температуре ферментную реакцию останавливают добавлением 40 мкл/лунку раствора ИМАР Progressive Binding Solution (согласно протоколу производителя (Molecular Devices) с применением 75% 1× буфера А и 25% 1× буфера В с 1:600 Progressive Binding Solution). Через 60 мин инкубирования при комнатной температуре в темноте считывают FP сигнал. Флуоресценцию при 535 нм измеряют с применением параллельных и перпендикулярных фильтров для определения различий во вращении из-за связывания фосфорилированного субстратного пептида с гранулами. Значения рассчитывают как процент различий в считывании (Δ мПи) контрольных образцов с и без АТФ. Значения IC_{50} определяют подбором кривой результатов эксперимента в Dotmatics. Результаты представлены в табл. 1.

Активность ИТК фермента измеряют с применением ИМАР (флуоресцентной поляризацией на основе иммобилизованных аффинных ионов металла) как описано ниже.

ИТК фермент (Millipore #14-660M) разводят до 0,2 Ед/мл в KR буфере (10 мМ Tris-HCl, 10 мМ MgCl₂, 0,01% Tween-20, 0,1% NaN₃, 1 мМ ДТТ, 2 мМ MnCl₂, pH 7,5)

Серийные разведения log10 от 2 мМ до 63,2 нМ тестируемых соединений проводят в 100% ДМСО. Затем разведения в ДМСО разводят 50-кратно в KR-буфере. Конечный интервал концентрации соединения в анализе составляет от 10 мкМ до 0,316 нМ.

Анализ проводят следующим образом: 5 мкл/лунку тестируемого соединения в KR буфере (конечная концентрация ДМСО в анализе составляет 1%) смешивают с 5 мкл/лунку 0,2 Ед/мл ИТК фермента (конечная концентрация в анализе составляет 0,05 Ед/мл (8,4 нМ)). Тестируемое соединение и ИТК фермент предварительно инкубируют в течение 60 минут при комнатной температуре, затем добавляют 5 мкл/лунку 200 нМ Fluorescein-меченного субстратного пептида (субстрат Blk/Lyntide, #R8124, Molecular Devices) в KR-буфере. Конечная концентрация пептидного субстрата в анализе составляет 50 нМ. Киназный анализ начинают добавлением 5 мкл/лунку 20 мкМ АТФ в KR-буфере (конечная концентрация АТФ составляет 5 мкМ АТФ, Км АТФ в ИТК ИМАР анализе). После инкубирования в течение 2 ч при комнатной температуре ферментную реакцию останавливают добавлением 40 мкл/лунку раствора ИМАР Progressive Binding Solution (согласно протоколу производителя (Molecular Devices) с применением 60% 1× буфера А и 40% 1× буфера В с 800× разведенными гранулами (Progressive Binding System, Molecular Devices #R8124). Через 60 мин инкубирования при комнатной температуре в темноте считывают FP сигнал. Флуоресценцию при 535 нм измеряют с применением параллельных и перпендикулярных фильтров для определения различий во вращении из-за связывания фосфорилированного субстратного пептида с гранулами. Значения рассчитывают как процент различий в считывании (Δ мПи) контрольных образцов с и без АТФ. Значения IC_{50} определяют подбором кривой результатов эксперимента в Dotmatics.

Активность ТЕС фермента измеряют с применением анализа LanthaScreen от ThermoFisher как описано ниже.

Фермент ТЕС (LifeTech #PV3269) и Eu-анти-HIS антитело (Invitrogen #PV5596) смешивают и разводят в киназном буфере (50 мМ Hepes pH 7,5+10 мМ MgCl₂+1 мМ ЭГТК+0,01% Brij-35) до 3 и 6 нМ соответственно. Конечная концентрация в анализе для фермента и антитела составляет 1 и 2 нМ соответственно.

Метку (Киназная метка 178, Invitrogen #PV5593) разводят в киназном буфере до 3 нМ. Конечная концентрация в анализе составляет 1 нМ.

Серийные разведения log10 от 1 мМ до 3,16 нМ тестируемых соединений проводят в 100% ДМСО. Затем разведения в ДМСО разводят 33-кратно в киназном буфере (50 мМ Hepes pH 7,5+10 мМ MgCl₂+1 мМ ЭГТК+0,01% Brij-35).

Анализ проводят следующим образом: 5 мкл/лунку разведения ТЕС фермента и EU-анти-His антитела смешивают с 5 мкл/лунку разведения метки и 5 мкл/лунку разведения соединения в киназном буфере. Конечная концентрация соединения в анализе составляет от 10 мкМ до 0,316 нм, с 1% ДМСО конечной концентрацией в анализе. После 2 ч инкубирования при комнатной температуре считывают TR-FRET сигнал при 615 и 665 нм. Отношение 665/615 используют для расчета значений, выраженных как процент от разницы в считывании (S/N) контрольных образцов с и без метки. Значения IC_{50} определяют подбором кривой результатов эксперимента в Dotmatics.

Активность ВМХ, ТХК, EGFR, ERBB2, ERBB4, JAK3, ВЛК киназы измеряют с применением Z'-LYTE анализа на Thermo Fisher. 10-точечную дозозависимый эффект (конечная концентрация в анализе составляет от 10 мкМ до 0,5 нМ в 3-кратном разведении на шаг разведения) строят для 1 ч инкубирования тестируемого соединения с киназой до инициации киназной реакции добавлением АТФ. Концентрация АТФ в анализе составляет Км АТФ для конечных киназ. Значения IC_{50} определяют подбором кривой результатов эксперимента в Thermo Fisher.

Пример 5. ТКБ ИМАР с АТФ конкуренцией для исследования ковалентного связывания соединений. Активность ТКБ фермента с АТФ конкуренцией измеряют с применением ИМАР (флуоресцентной поляризацией на основе иммобилизованных аффинных ионов металла) анализа.

ТКБ фермент (Millipore) разводят до 16 нМ, соответственно, в буфере для киназной реакции (KR) (10 мМ Tris-HCl, 10 мМ MgCl₂, 0,01% Tween-20, 0,1% NaN₃, 1 мМ ДТТ, 2 мМ MnCl₂, pH 7,5).

Серийные разведения log₁₀ от 1 мМ до 31,6 нМ тестируемых соединений получают в 100% ДМСО. Разведения в ДМСО затем разводят 25-кратно в KR-буфере. Конечные концентрации соединения составляют от 10 мкМ до 0,316 нМ.

Анализ проводят следующим образом: 5 мкл/лунку тестируемого соединения в KR буфере (конечная концентрация ДМСО в анализе составляет 1%) смешивают с 5 мкл/лунку ТКБ или ИТК фермента (конечная концентрация в анализе составляет 4 и 8 нМ для ТКБ и ИТК, соответственно). Тестируемые соединения и киназный фермент прединкубируют 0, 30 или 60 мин, затем добавляют 5 мкл/лунку 200 нМ Fluorescein-меченого субстратного пептида (Blk/Lyntide субстрат, Molecular Devices) в KR-буфере. Конечная концентрация пептидного субстрата составляет 50 нМ. Киназный анализ начинают добавлением 5 мкл/лунку 20, 100 или 400 мкМ АТФ в KR-буфере (конечная концентрация АТФ составляет 5,25 или 100 мкМ АТФ). После инкубирования в течение 2 ч при комнатной температуре ферментную реакцию останавливают добавлением 40 мкл/лунку раствора ИМАР Progressive Binding Solution (Molecular Devices), согласно инструкциям производителя, с применением 60% 1× буфера А и 40% 1× буфера В с 800× разведенными гранулами). Через 60 мин инкубирования при комнатной температуре в темноте считывают FP сигнал. Флуоресценцию при 535 нм измеряют с применением параллельных и перпендикулярных фильтров для определения различий во вращении из-за связывания фосфорилированного субстратного пептида с гранулами. Значения рассчитывают как процент различий в считывании (Δ мПи) контрольных образцов с и без АТФ. Значения IC₅₀ определяют подбором кривой результатов эксперимента в Dotmatics.

Хотя стандартный анализ ИМАР показал, что метаболит M27 является ингибитором ТКБ, дальнейшее тестирование требуется для определения того, является ли M27 ковалентным ингибитором. M27 тестируют в ТКБ ИМАР АТФ конкурентных анализах с разным временем прединкубирования (0, 30 и 60 мин) и концентрациях АТФ (5, 25 и 100 мкМ). Результаты в табл. 2 и на фиг. 2 подтверждают, что M27 является ковалентным ингибитором ТКБ. Повышение времени прединкубирования дает сдвиг в эффективности M27. Более того, имеется потеря АТФ конкуренции после прединкубирования ТКБ с M27, результат, который характерен для соединений, которые связываются ковалентно.

Таблица 2

АТФ, мкМ	IC ₅₀ (нМ)		
	M27		
	0 минут	30 минут	60 минут
5	27,3	12,6	6,9
25	72,4	18,1	9,5
100	101,0	23,7	10,8

Пример 6. ТКБ-ДТ и ТКБ-C481S LanthaScreen для исследования ковалентного связывания соединений

Ингибирующее действие на дикий тип ТКБ (ТКБ-ДТ) и мутант ТКБ Cys481Ser (ТКБ-C481S) измеряют с применением методики анализа LanthaScreen от ThermoFisher согласно протоколу производителя.

ТКБ-ДТ или ТКБ-C481S (Genscript) смешивают и разводят с Eu-анти-GST антителом (Invitrogen) в киназном буфере (50 мМ Hepes pH 7,5+10 мМ MgCl₂ + 1 мМ ЭГТК+0,01% Brij-35) до 15 и 6 нМ соответственно. Конечная концентрация в анализе для фермента и антитела составляет 5 и 2 нМ соответственно.

Метку (киназная метка 236, Invitrogen) разводят в киназном буфере до 90 нМ. Конечная концентрация в анализе составляет 30 нМ.

Серийные разведения log₁₀ от 1 мМ до 3,16 нМ тестируемых соединений делают в 100% ДМСО. Разведения в ДМСО затем разводят 33-кратно в киназном буфере (50 мМ Hepes pH 7,5+10 мМ MgCl₂+1 мМ ЭГТК+0,01% Brij-35).

Анализ проводят следующим образом: 5 мкл/лунку разведение ТКБ-ДТ или ТКБ-C481S фермента и Eu-анти-GST антитела смешивают с 5 мкл/лунку разведением метки и 5 мкл/лунку разведением соединения в киназном буфере. Конечная концентрация соединения в анализе составляет от 10 мкМ до 0,316 нМ, с 1% ДМСО конечной концентрацией в анализе. Смесь инкубируют при комнатной температуре в темноте и с разным временем инкубирования (5, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 180 и 300 мин), TR-FRET сигнал считывают при 615 и 665 нм. Отношение 665/615 применяют для расчета значений, выраженных как процент различий считываний (S/N) контрольных образцов с и без метки. Значения IC₅₀ для каждого момента времени определяют подбором кривой результатов эксперимента в Dotmatics.

Для подтверждения ковалентного ингибирования M27, ингибирующее действие M27 исследуют на ТКБ-ДТ и мутанте ТКБ Cys481Ser (ТКБ C481S) с применением методики анализа LanthaScreen от ThermoFisher согласно протоколу производителя. Измерения IC₅₀ проводят в разные моменты времени после инкубирования соединений с ТКБ и ТКБ-C481S. Результаты, изображенные на фиг. 9, подтверждают

ковалентное связывание M27 с ТКБ. Разница в эффективности между ТКБ-ДТ и ТКБ-С4 81S показывает действие ковалентного связывания соединений с ТКБ. Полученные IC50 с применением ТКБ-С481S отражают обратимое ингибирование и не изменяются или незначительно изменяются во времени. Повышение эффективности, наблюдаемое для ТКБ-ДТ, возникает из способности M27 ковалентно связываться с С481 в АТФ кармане ТКБ. Кинетика в ковалентном связывании определяется аффинностью соединения к ТКБ и реакционной способностью электрофила.

С применением данных для M27 из анализа LanthaScreen для ТКБ-ДТ, константы ингибирования могут быть рассчитаны для исходного соединения и метаболита. Для определения констант ингибирования более точно, эксперименты LanthaScreen повторяют для включения дополнительных более ранних моментов времени после начала инкубирования. Результаты этих экспериментов суммированы в табл. 3. Ki и параметры скорости инактивации фермента определяют из значений IC50 во времени, согласно способу Grippendorff et al. (J Biomol Screen. 2009, 14(8):913-23) с измеренным Km=102 нМ для метки, применяемой в анализе.

Таблица 3

Соединение	Ki (нМ)	скорость инактивации фермента (с ⁻¹)	Скорость инактивации фермента/Ki (с ⁻¹ *М ⁻¹)*
M27	188±9	0,0031±0,0003	1,65E+04±7,77E+02

Пример 7. ТКБ занятость цели в В клетках Ramos

В клетки Ramos (ATCC, кат.№ CRL-1923) помещают в 24-луночных культуральных планшетах при 2×10^6 клеток на лунку в общем объеме 900 мкл DMEMF12 + 10% ФТС+2 мМ L-Glutamine+Pen/Strep. Выдерживают клетки в течение 1 ч при 5-7% CO₂ и 37°C.

Серийные разведения log10 от 10 мМ до 316 нМ тестируемых соединений получают в 100% ДМСО, затем 100-кратно разводят в культуральной среде.

Для каждой лунки 100 мкл переносят в was then transferred to лунки планшета, содержащего 900 мкл В клеток Ramos. Интервал конечной концентрации соединения в анализе варьируется от 10 мкМ до 0,316 нМ, с конечной концентрацией ДМСО 0,1% и инкубируют при 5-7% CO₂ и 37°C в течение 2 ч. Затем клетки собирают для измерения занятости цели ТКБ с применением ELISA занятости цели ТКБ как описано ниже.

Процент связанной с лекарственным средством ТКБ в образцах В клеток Ramos определяют методом на основе ELISA следующим образом: 96-луночные планшеты OptiPlate (Perkin Elmer) покрывают 125 нг/лунку анти-ТКБ Ab (BD Biosciences) и блокируют АБС (Sigma-Aldrich). Образцы, содержащие В клетки Ramos, лизируют на ледяном лизисном буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl pH 7,5, 250 мМ сахарозы, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреитола (ДТТ), 0,05% дигитонина и смесь ингибиторов протеаз (Sigma-Aldrich). Лизаты клеток затем инкубируют в течение 1 ч в отсутствие или присутствии 1 мкМ акалабрутиниба, насыщающей концентрации, которая дает полную занятость ТКБ. Конечное количество лизата клеток, применяемое на лунку в ELISA занятости цели ТКБ является типовым для 2×10^5 В клеток Ramos. Различие с сигналом лизатов клеток, не инкубированных с избытком акалабрутиниба, представляет свободную ТКБ (не занятую ингибитором ТКБ). Образцы инкубируют в течение 1 ч с биотиновой меткой соединения формулы (II) (100 нМ). Эту пробу ковалентно связывают с Cys481 в АТФ кармане в ТКБ, когда АТФ карман не занят ковалентным ингибитором ТКБ. Каждый образец затем добавляют дважды в полученный Optiplate и инкубируют в течение 2 ч при температуре окружающей среды. Планшеты промывают ФРФБ+0,05% Tween20 четыре раза. Стрептавидин-HRP (Invitrogen; степень ELISA) добавляют при 100 мкл/лунку (120 нг/мл) и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывают ФРФБ+0,05% Tween20 три раза и затем промывают ФРФБ (без Tween 20) два раза. Добавляют сто мкл/лунку SuperSignal ELISA Femto Substrate (ThermoFisher Scientific) и затем хемилуминесценцию измеряют через 1 мин (планшетный ридер Envision®; PerkinElmer). Процент занятости ТКБ для каждого образца рассчитывают относительно контрольного носителя. Сигнал от контрольного носителя без экзогенного акалабрутиниба представляет 100% свободную ТКБ (или 0% занятую ТКБ), а сигнал от контрольного носителя с экзогенным акалабрутинибом представляет 0% свободную ТКБ (или 100% занятую ТКБ). Инкубирование каждого лизата клеток с 1 мкМ акалабрутиниба применяют для коррекции фонового сигнала, не связанного со свободной ТКБ:

% свободной ТКБ образец X=(Образец X - Образец X+лекарственное средство [1 мкМ])/(за 1 день до введения - за один день до введения+лекарственное средство [1 мкМ]) × 100%

% занятой ТКБ=100% - % свободной ТКБ

Связывание M27 с ТКБ в клетках проводят с применением колонии клеток Ramos (лимфома Буркитта). Клетки Ramos инкубируют с интервалом дозы M27 и занятости цели ТКБ, определенным ELISA. Результаты показаны на фиг. 10 и в табл. 4. Эти данные также подтверждают, что M27 ковалентно связывается с ТКБ в клетках Ramos, в соответствии с настройкой целевого ELISA для определения занято-

сти ТКБ, обратимый ингибитор будет вымыт во время анализа.

Таблица 4

Параметр	M27 IC ₅₀ (нМ)
Занятость цели ТКБ	39

Пример 8. Анализ моноклеарной клетки периферической крови человека (МКПК) CD69 и анализ в ЦК

Цельную кровь собирают в покрытые гепарином пробирки Vacutainer (BD Biosciences, San Jose, CA) и применяют для выделения МКПК с применением Ficoll-Нупраке (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Выделенные МКПК криоконсервируют в 90% ФТС/10% ДМСО до применения.

Клетки после криогенного хранения оттаивают на бане с водой 37°C, разводят RPMI/1% ФТС, промывают 2 раза и затем посещают при 2×10^5 клеток на лунку в RPMI/10% ФТС в 96-луночные планшеты.

Серийные разведения \log_{10} от 10 мМ до 316 нМ тестируемых соединений получают в 100% ДМСО, затем 100-кратно разводят в RPMI/1% ФТС. Для каждой лунки 10 мкл затем переносят в планшет с глубокими лунками, содержащий 90 мкл клеток МКПК. Интервал конечной концентрации соединения в анализе составляет от 10 мкМ до 0,316 нМ, с конечной концентрацией ДМСО 0,1%. МКПК затем инкубируют в течение 2 ч при 37°C в присутствии или отсутствии тестируемых соединений, до стимулирования козьим F(ab')₂ анти-IgM (Southern Biotech, #2022-14, конечная концентрация в анализе 5 мкг/мл) в течение 18 ч.

После стимулирования анти-IgM, МКПК инкубируют на льду в течение 30 мин с анти-CD69-FITC, анти-CD19-BV421 (BD Biosciences #555530 и #562440, соответственно) и 7AAD (Life Technologies #A1310). Проточную цитометрию проводят, и значения флуоресценции получают из CD69-FITC канала в CD19+ стробированных жизненных В клетках. Значения EC₅₀ определяют подбором кривой результатов эксперимента с применением GraphPad Prism.

Анализ МКПК:

Криоконсервированные МКПК оттаивают, промывают и суспендируют в 2×10^5 клеток/лунке в RPMI+10% ФТС в 96-луночных планшетах. Тестируемые соединения добавляют с применением $\frac{1}{2}$ \log титрования дозы (конечная концентрация от 10 мкМ до 0,316 нМ) и инкубируют в течение 2 ч инкубирования при 37°C, 5% CO₂. Конечная концентрация ДМСО в анализе составляет 0,1%. Для промывочной части эксперимента, МКПК центрифугируют и клеточную лепешку ресуспендируют в культуральной среде без тестируемого соединения. Это повторяют дважды. К МКПК с и без промывки добавляют козье античеловеческое IgM F(ab')₂ антитело (Southern Biotech) (конечная концентрация 5 мкг/мл), и клетки инкубируют в течение еще 18 ч. Затем клетки метят CD69-FITC и CD19-BV421 антителами (BD Biosciences) в течение 30 мин при 4°C. После промывания несвязанного антитела, 7-AAD добавляют как меру выживаемости, затем проводят проточную цитометрию с применением инструмента FACSVerse (BD Biosciences). Процент CD69-положительных клеток получают из CD19+ В лимфоцитного гейта с применением аналитической программы FCSExpress (De Novo Software). Значения EC₅₀ определяют подбором кривой результатов эксперимента с применением Dotmatics.

Анализ ЦК:

Сорок пять мкл крови разводят 1:1 в RPMI+1% ФТС и инкубируют с тестируемым соединением, как описано выше. Клетки крови стимулируют 10 мкг/мл мышинным анти-человеческим анти-IgD антителом (BD Biosciences, конечная концентрация в анализе 10 мкг/мл) и инкубируют в течение 18 ч. Клетки метят CD69-FITC, CD86-PE и CD19-BV421 (BD Biosciences) в течение 15 мин при комнатной температуре, затем проводят лизис ККК с раствором FACS Lysing Solution (BD Biosciences). Клетки промывают 3 раза 1 мл/лунку ФРФБ+0,5% АБС, затем проводят проточный цитометрический анализ. Значения средней интенсивности флуоресценции для CD69 получают из CD19+ В лимфоцитного гейта с применением аналитической программы FCSExpress (De Novo Software). Значения EC₅₀ определяют подбором кривой результатов эксперимента с применением Dotmatics.

Эффективность ингибиторов ТКБ в первичных В клетках может быть оценена в анализах, которые оценивают функциональные изменения после BCR-активации в присутствии ингибитора. Ингибирование специфических фосфорилированных эпитопов на сигнальных белках и более удаленные меры активации BCR, такие как повышенная экспрессия CD86 (B7-2) и CD69 на поверхности клеток могут быть измерены проточной цитометрией (см. Report R2013003A). В этом исследовании оценивают действие M27 на экспрессию CD69. Результаты активации CD69 в препаратах человеческих МКПК и ЦК суммированы в табл. 5.

Таблица 5

Анализ	M27 EC ₅₀ (нМ)	Формула (II)
		EC ₅₀ (нМ)
чМПК: анти-IgM-индуцированные CD69	26±16	19±6
чЦК: анти-IgD-индуцированные CD69	64±6	137±36

Данные (табл. 5) подтверждают открытия, что M27 является ковалентным ингибитором ТКБ, и M27 ковалентно связывается с и полностью занимает ТКБ в В клетках Ramos.

Пример 9. Анализ профиля кинома M27

Анализ профиля киназ проводят с M27 на DiscoverX в однократной дозе 1 мкМ для всех доступных киназ (KINOMEscan). Общая оценка селективности киназ представлена в табл. 6. Результаты показывают общий профиль селективности киназ для M27 при 1 мкМ. Киназы, ингибированные >65% при 1 мкМ для M27 сопровождаются дозозависимым эффектом на DiscoverX. Значения K_d, определенные в этом эксперименте, перечислены в табл. 7. M27 имеет значения IC₅₀ <1 мкМ для практически того же набора киназ, за исключением ТХК, но с дополнительным ингибированием BRK (РТК6).

Таблица 6. Результаты оценки селективности из анализа профиля KINOMEscan (DiscoverX scanMAX) для M27

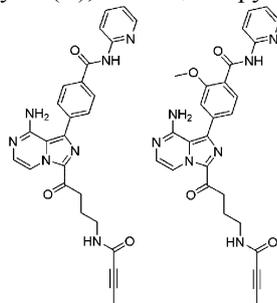
Киназа	Оценка селективности
	M27
S (35)	0,013
S (10)	0,005
S (1)	0

Таблица 7. Значения K_d киназ с >65% ингибированием при 1 мкМ для M27 (НТ=не тестировали)

Киназа	K _d (нМ)
	M27
ТКБ	29
BMX	190
BRK (РТК6)	150
ERBB2	120
ERBB4	970
LIMK1	400
MEK5	69
TEC	40
ТХК	1100

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I) или формулы (II), имеющее структуры



(I) (II)

или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1, где соединением является соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Соединение по п.1, где соединением является соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемая соль.

4. Применение соединения по п.2 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения гиперпролиферативного расстройства, выбранного из группы, состоящей из хронического лимфоцитарного

лейкоза, мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза, неходжкинской лимфомы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, лимфомы Ходжкина, В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, лимфомы Буркитта, макроглобулинемии Вальденстрема, множественной миеломы, миелодиспластических синдромов или миелофиброза.

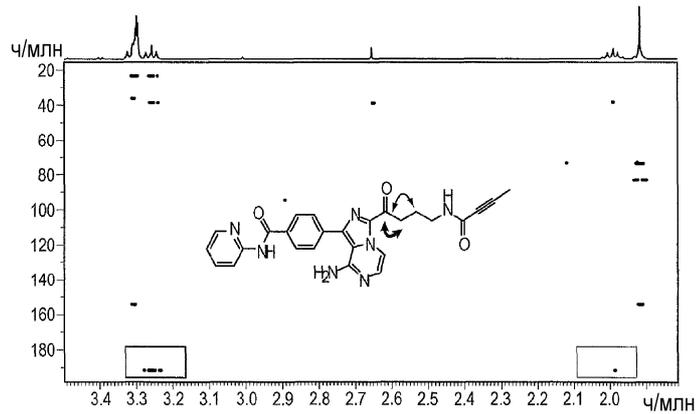
5. Применение по п.4, где пролиферативным расстройством является хронический лимфоцитарный лейкоз.

6. Применение по п.4, где пролиферативным расстройством является мелкоклеточный лимфоцитарный лейкоз.

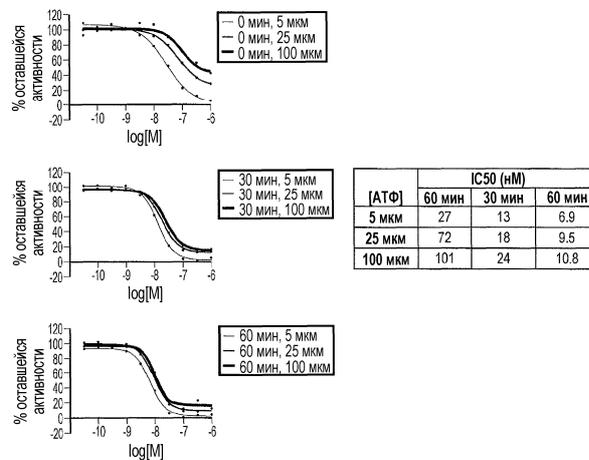
7. Применение по п.4, где пролиферативным расстройством является мантийноклеточная лимфома.

8. Применение по п.4, где пролиферативным расстройством является диффузная В-крупноклеточная лимфома.

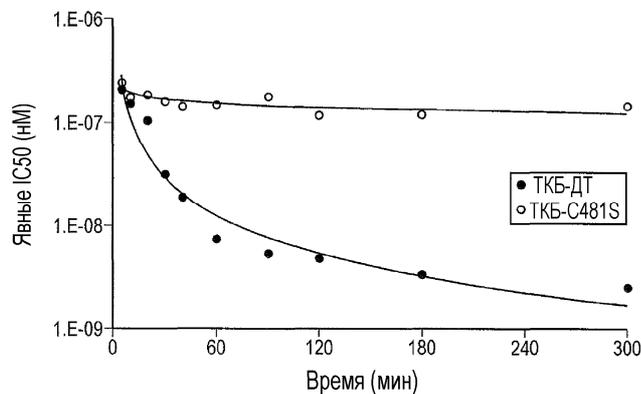
9. Применение по п.4, где пролиферативным расстройством является макроглобулинемия Вальденстрема.



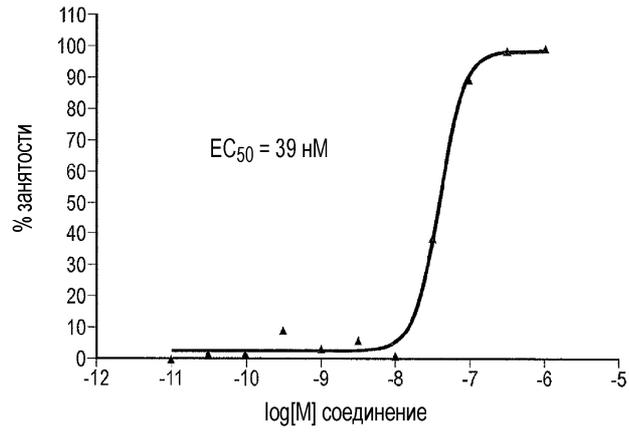
Фиг. 1



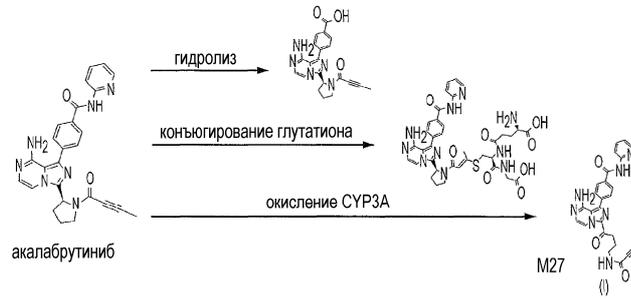
Фиг. 2



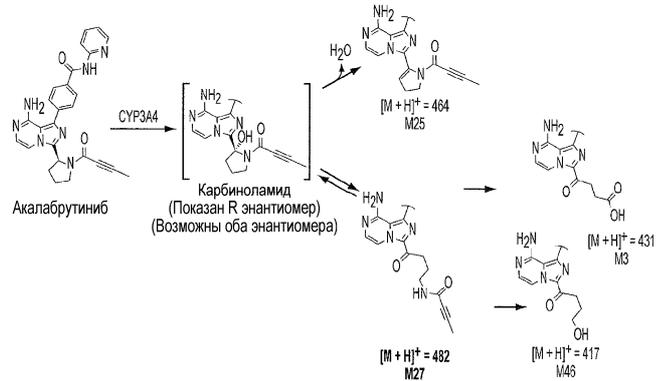
Фиг. 3



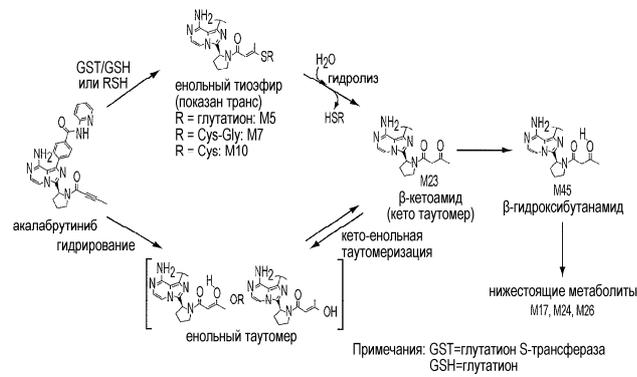
Фиг. 4



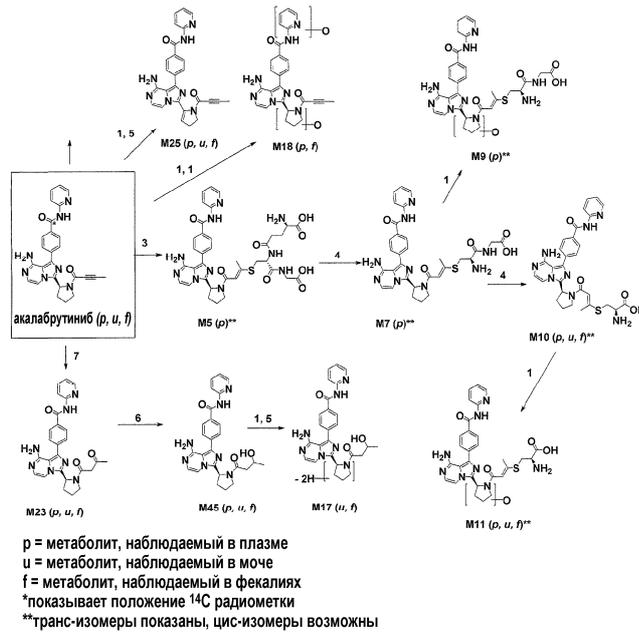
Фиг. 5



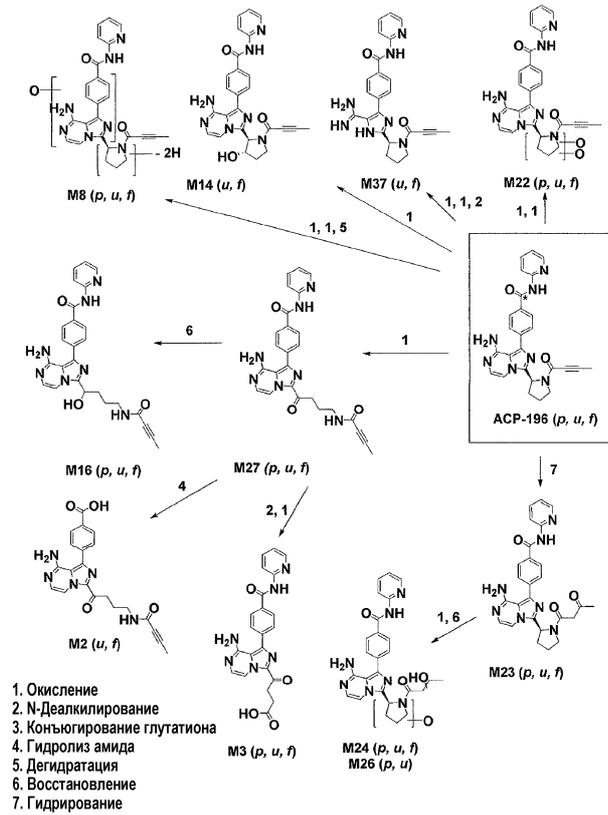
Фиг. 6



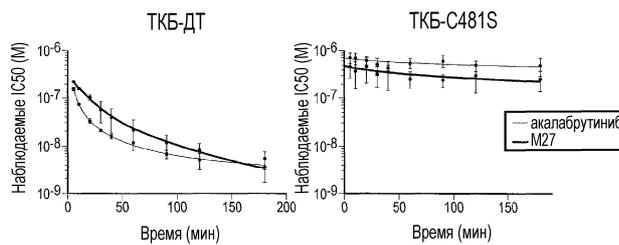
Фиг. 7



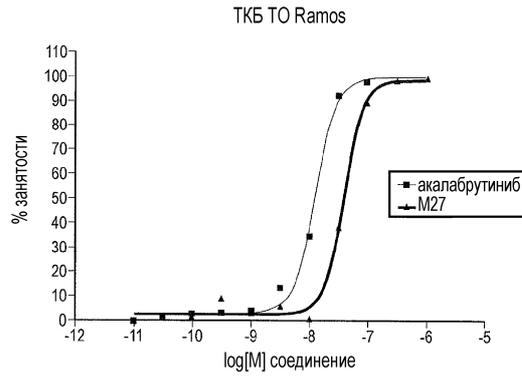
Фиг. 8А



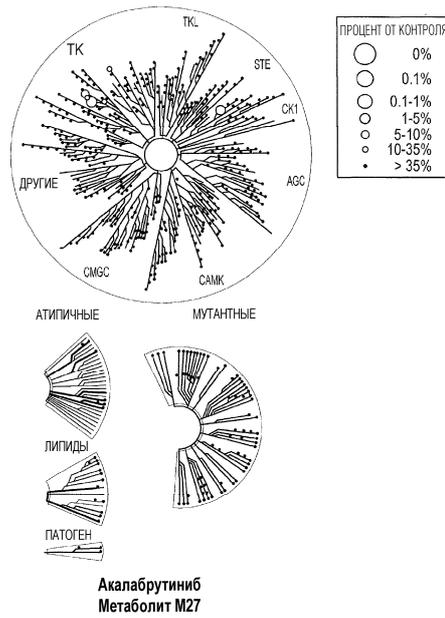
Фиг. 8В



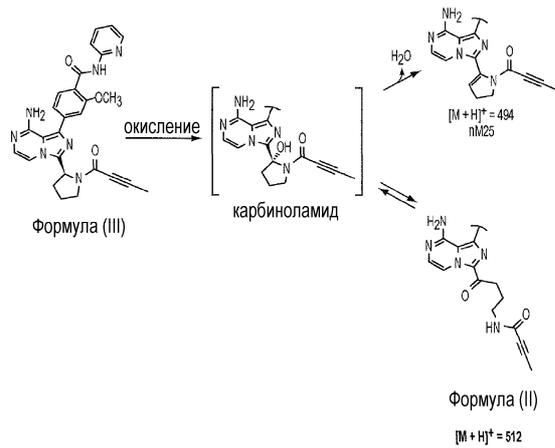
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

