

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190681** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.05.28

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

(22) Дата подачи заявки
2019.09.03

(54) АМИДЫ ДИМЕТИЛАМИНОАЗЕТИДИНА В КАЧЕСТВЕ JAK ИНГИБИТОРОВ

(31) **62/726,562**

(32) **2018.09.04**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/049276**

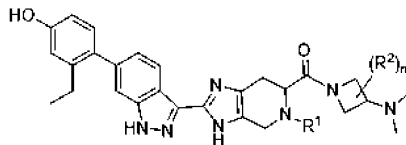
(87) **WO 2020/051105 2020.03.12**

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

(72) Изобретатель:
**Лонг Дэниэл Д., Смит Камерон,
Томпсон Корбин (US)**

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

(57) Изобретение представляет соединения формулы (I)



(I)

где переменные определены в описании, или их фармацевтически приемлемую соль, которые пригодны в качестве ингибиторов киназы JAK. Изобретение также представляет фармацевтические композиции, содержащие такие соединения, и способы применения таких соединений для лечения респираторных заболеваний.

202190681

A1

A1

202190681

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567121EA/026

АМИДЫ ДИМЕТИЛАМИНОАЗЕТИДИНА В КАЧЕСТВЕ JAK ИНГИБИТОРОВ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Изобретение относится к соединениям, которые пригодны в качестве ингибиторов киназы Янус-киназа (JAK). Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим такие соединения, и способам применения таких соединений для лечения респираторных заболеваний.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Астма является хроническим заболеванием дыхательных путей, для которого отсутствуют средства профилактики или лечения. Заболевание характеризуется воспалением, фиброзом, гиперреактивностью и ремоделированием дыхательных путей, и все это приводит к ограничению воздушного потока. По оценкам, 300 миллионов человек во всем мире страдают астмой, и предполагается, что к 2025 году количество людей, страдающих астмой, вырастет более чем на 100 миллионов. В Соединенных Штатах Америки астмой страдают от 6% до 8% населения, что делает ее одной из самых распространенных хронических заболеваний в стране. Хотя большинство пациентов могут контролировать симптомы астмы с помощью ингаляционных кортикостероидов, которые можно комбинировать с модификатором лейкотриена и/или бета-агонистом длительного действия, остается подгруппа пациентов с тяжелой астмой, у которых заболевание не контролируется обычными методами лечения. Тяжелая персистирующая астма определяется как заболевание, которое остается неконтролируемым при высоких дозах ингаляционных кортикостероидов. В то время как на долю тяжелых астматиков, судя по оценкам, приходится приблизительно 5% всех больных астмой, они имеют высокий риск заболеваемости и смертности и на них приходится непропорционально высокая доля используемых ресурсов здравоохранения среди астматиков. По-прежнему существует потребность в новых методах лечения этих пациентов.

Цитокины представляют собой межклеточные сигнальные молекулы, которые включают хемокины, интерфероны, интерлейкины, лимфокины и фактор некроза опухоли. Цитокины имеют решающее значение для нормального роста клеток и иммунорегуляции, но они также вызывают иммунные заболевания и способствуют росту злокачественных клеток. Патология воспаления при астме ассоциирована с повышенными уровнями многих цитокинов. Например, было показано, что терапия на основе антител, направленная на интерлейкины (IL) 5 и 13, является клинически эффективной у подгрупп пациентов с тяжелой астмой. Многие из цитокинов, участвующих в воспалении астмы, действуют через сигнальные пути, зависящие от тирозинкиназ семейства Янус (Janus, JAK), которые передают сигнал через семейство транскрипционных факторов преобразователей сигналов и активаторов транскрипции (STAT). Цитокины, участвующие в воспалении астмы, передающие сигналы через путь JAK-STAT, включают IL-2, IL-3, IL-4, IL 5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-13, IL-23, IL-31, IL-27, тимический стромальный лимфопоэтин

(TSLP), интерферон- γ (IFN γ) и колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF).

Семейство JAK состоит из четырех членов: JAK1, JAK2, JAK3 и тирозинкиназы 2 (TYK2). Связывание цитокина с JAK-зависимым цитокиновым рецептором вызывает димеризацию рецептора, что приводит к фосфорилированию остатков тирозина на киназе JAK, влияя на активацию JAK. Фосфорилированные JAK, в свою очередь, связывают и фосфорилируют различные белки STAT, которые димеризуются, интернализуются в ядре клетки и непосредственно модулируют транскрипцию генов, приводя, среди прочего, к нисходящим эффектам, ассоциированным с воспалительным заболеванием. JAK обычно ассоциированы с рецепторами цитокинов парами в виде гомодимеров или гетеродимеров. Определенные цитокины связаны с определенными спаренными JAK. Каждый из четырех членов семейства JAK участвует в передаче сигналов по меньшей мере одного из цитокинов, ассоциированных с воспалением астмы. Следовательно, химический ингибитор с пан-активностью, направленной против всех членов семейства JAK, может модулировать широкий спектр провоспалительных путей, которые способствуют развитию тяжелой астмы.

Однако широкий противовоспалительный эффект таких ингибиторов может подавлять нормальную функцию иммунных клеток, потенциально приводя к повышенному риску инфицирования. Доказательства повышенного риска инфицирования наблюдали при применении ингибитора JAK тофацитиниба, вводимого перорально для лечения ревматоидного артрита. При астме воспаление локализуется в дыхательных путях. Воспаление дыхательных путей характерно и для других респираторных заболеваний, помимо астмы. Хроническая обструктивная болезнь легких (COPD), муковисцидоз (CF), пневмонит, интерстициальные заболевания легких (включая идиопатический легочный фиброз), острое повреждение легких, острый респираторный дистресс-синдром, бронхит, эмфизема и саркоидоз также являются заболеваниями дыхательных путей, патофизиология которых считается связанной с цитокинами, передающими сигнал через JAK. Местное введение ингибитора JAK в легкие путем ингаляции может быть терапевтически эффективным за счет доставки мощного антицитокинового агента непосредственно к месту действия, ограничивая системное воздействие и, таким образом, ограничивая возможность неблагоприятной системной иммуносупрессии. Сохраняется потребность в сильном ингибиторе JAK, подходящем для местного введения в легкие для лечения респираторного заболевания.

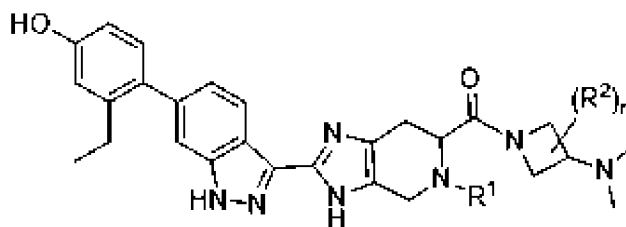
Цитокины, передающие сигнал через JAK, также играют важную роль в активации Т-клеток, подтипа иммунных клеток, которые являются центральными для многих иммунных процессов. Патологическая активация Т-клеток имеет решающее значение в этиологии многочисленных респираторных заболеваний. Аутореактивные Т-клетки играют роль в облитерирующем бронхиолите с организующейся пневмонией (также называемом COS). Подобно COS, этиология отторжения легочного трансплантата связана с aberrантной активацией Т-клеток реципиента трансплантированным легким донора.

Отторжение легочного трансплантата может произойти на ранней стадии в виде первичной дисфункции трансплантата (PGD), организующейся пневмонии (OP), острого отторжения (AR) или лимфоцитарного бронхолита (LB), или оно может возникнуть спустя годы после трансплантации легкого в виде хронической дисфункции легочного трансплантата (CLAD). CLAD ранее известная как облитерирующий бронхолит (BO), теперь считается синдромом, который может иметь различные патологические проявления, включая BO, рестриктивную CLAD (rCLAD или RAS) и нейтрофильную дисфункцию аллотрансплантата. Хроническая дисфункция легочного аллотрансплантата (CLAD) является серьезной проблемой при долгосрочном лечении реципиентов легочного трансплантата, поскольку она приводит к постепенной утрате функциональности пересаженного легкого (Gauthier et al., *Curr. Transplant. Rep.*, 2016, 3(3), 185-191). CLAD плохо поддается лечению, и поэтому остается потребность в эффективных соединениях, способных предотвращать или лечить это состояние. Некоторые JAK-зависимые цитокины, такие как IFN γ и IL-5, активируются при CLAD и отторжении легочного трансплантата (Berastegui et al., *Clin. Transplant.* 2017, 31, e12898). Более того, высокие уровни хемокинов CXCR3 в легких, таких как CXCL9 и CXCL10, которые находятся ниже JAK-зависимой передачи сигналов IFN, связаны с худшими исходами у пациентов с легочным трансплантатом (Shino et al, *PLOS One*, 2017, 12(7), e0180281). Было показано, что системное ингибирование JAK является эффективным при отторжении трансплантата почки (Vicenti et al., *American Journal of Transplantation*, 2012, 12, 2446-56). Следовательно, ингибиторы JAK могут быть эффективными при лечении или профилактике отторжения легочного трансплантата и CLAD. Аналогичные события активации Т-клеток, описанные в качестве основной причины отторжения легочного трансплантата, также считаются основной причиной болезни «легочный трансплантат против хозяина» (GVHD), которая может развиваться после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Подобно CLAD, GVHD легких является хроническим прогрессирующим заболеванием с чрезвычайно неблагоприятными исходами, и в настоящее время отсутствует одобренное лечение. В ретроспективном многоцентровом исследовании 95 пациентов с острой или хронической GVHD, резистентной к стероидам, которые получали системный ингибитор JAK руксолитиниб в качестве вспомогательной терапии, большинство пациентов продемонстрировало полный или частичный ответ на руксолитиниб, включая пациентов с GVHD легких (Zeiser et al, *Leukemia*, 2015, 29, 10, 2062-68). Поскольку системное ингибирование JAK связано с серьезными побочными эффектами и небольшим терапевтическим индексом, сохраняется потребность в ингалируемом несистемном ингибиторе JAK, направленном на легкие, для профилактики и/или лечения отторжения легочного трансплантата или GVHD легких.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном из аспектов изобретение предоставляет новые соединения, обладающие активностью ингибиторов киназы JAK.

Соответственно, изобретение предоставляет соединение формулы (I):



I

где:

n равен 0, 1 или 2;

R¹ представляет собой C₁₋₃ алкил; и

каждый R² независимо представляет собой C₁₋₃ алкил;

или его фармацевтически приемлемую соль.

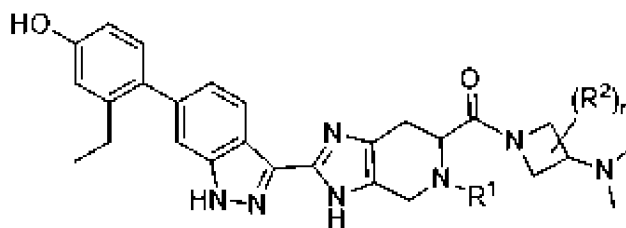
Изобретение также предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую соединение по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Изобретение также предоставляет способ лечения респираторного заболевания, в частности астмы и CLAD, у млекопитающего, причем способ включает введение млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения или фармацевтической композиции по изобретению.

Изобретение также предоставляет представленное в настоящем описании соединение по изобретению для применения в медицинской терапии, а также применение соединения по изобретению в производстве состава или лекарственного средства для лечения респираторного заболевания у млекопитающего.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном из аспектов изобретение предоставляет соединения, имеющие активность ингибитора киназы JAK. Соответственно, изобретение предоставляет соединение формулы (I):



(I)

где:

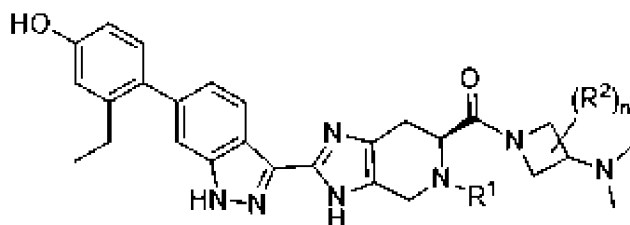
n равен 0, 1 или 2;

R¹ представляет собой C₁₋₃ алкил; и

каждый R² независимо представляет собой C₁₋₃ алкил;

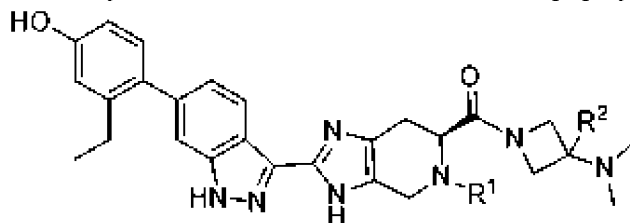
или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления соединение имеет формулу (II):



(II)

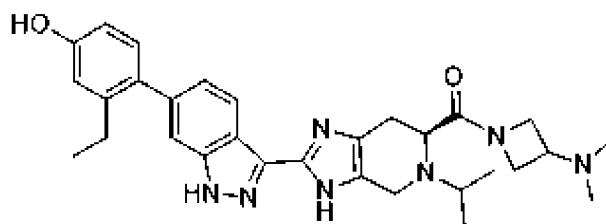
В некоторых вариантах осуществления соединение имеет формулу (III):



(III)

В некоторых вариантах осуществления R^1 выбирают из группы, состоящей из этила, пропила и изопропила. В некоторых вариантах осуществления n равен 0. В некоторых вариантах осуществления n равен 1. В некоторых вариантах осуществления n равен 1, и R^2 представляет собой метил.

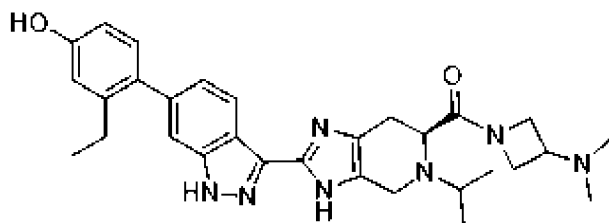
В другом варианте осуществления изобретение предоставляет соединение формулы 1:



1

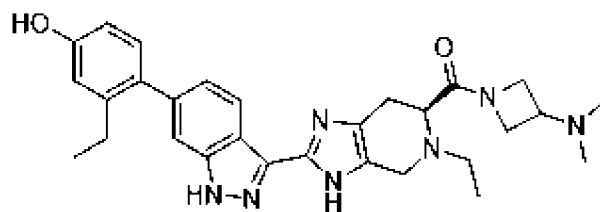
или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления изобретение предоставляет соединение формулы 1:



1

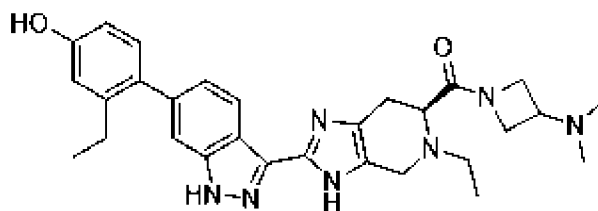
В другом варианте осуществления изобретение предоставляет соединение формулы 2



2

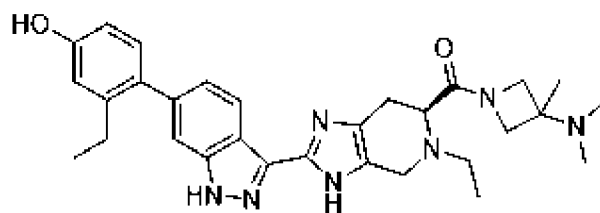
или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления изобретение предоставляет соединение формулы 2



2

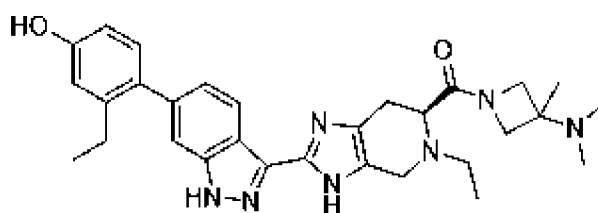
В другом варианте осуществления изобретение предоставляет соединение формулы 3



3

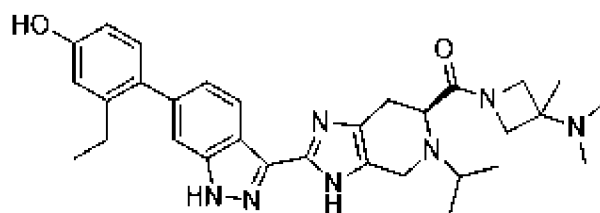
или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления изобретение предоставляет соединение формулы 3



3

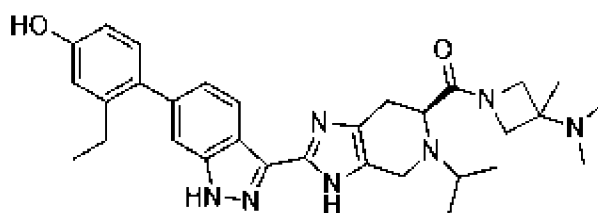
В другом варианте осуществления изобретение предоставляет соединение формулы 4



4

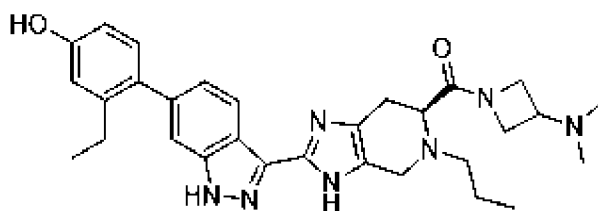
или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления изобретение предоставляет соединение формулы 4



4

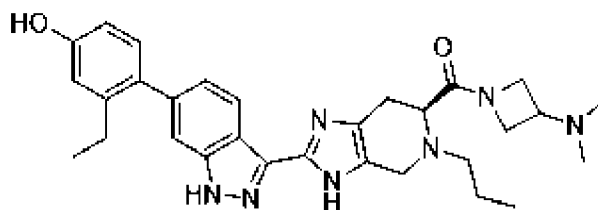
В другом варианте осуществления изобретение предоставляет соединение формулы 5



5

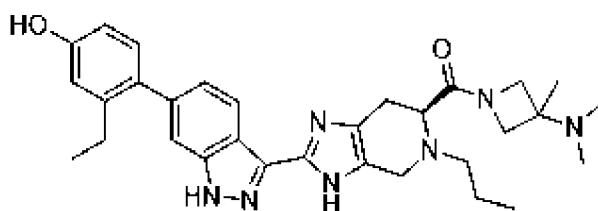
или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления изобретение предоставляет соединение формулы 5



5

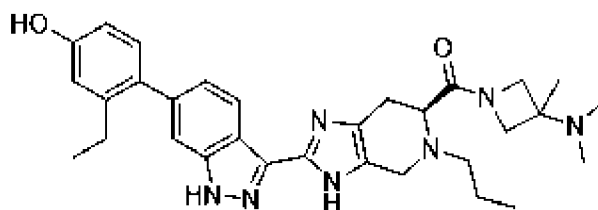
В другом варианте осуществления изобретение предоставляет соединение формулы 6



6

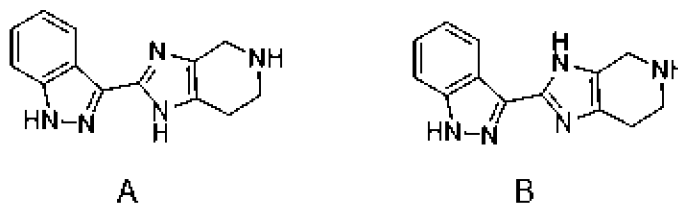
или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления изобретение предоставляет соединение формулы 6



Наименования химических структур приведены в настоящем описании в соответствии с соглашениями IUPAC, реализованными в программном обеспечении ChemDraw (PerkinElmer, Inc., Cambridge, MA). Соединение 1 обозначено как (S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-ил)метанол.

Кроме того, имидазо-часть тетрагидроимидазопиридинового фрагмента существует в таутомерных формах, проиллюстрированных ниже для фрагмента соединений по изобретению.



Согласно соглашению IUPAC, эти представления приводят к разной нумерации атомов имидазольной части: (1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-с]пиридин (структура A) по сравнению с (1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридином (структура B). Следует понимать, что несмотря на то, что структуры показаны или названы для конкретной формы, изобретение также включает его таутомер.

Соединения по настоящему изобретению могут содержать один или более хиральных центров, и поэтому такие соединения (и их промежуточные соединения) могут существовать в виде рацемических смесей; чистых стереоизомеров (т.е. энантиомеров или диастереомеров); смесей, обогащенных стереоизомерами, и т.п. Хиральные соединения, показанные или названные в настоящем описании, без определенной стереохимии в хиральном центре включают любые или все возможные варианты стереоизомеров в неопределенном стереоцентре, если не указано иное. Изображение или наименование конкретного стереоизомера означает, что указанный стереоцентр имеет указанную стереохимию, предполагая, что также могут присутствовать незначительные количества других стереоизомеров, если не указано иное, при условии, что присутствие другого стереоизомера не исключает пользу изображенного или названного соединения.

Соединения по настоящему изобретению также могут содержать несколько основных групп (например, аминогрупп), и, следовательно, такие соединения могут существовать в виде свободного основания или в различных солевых формах, таких как монопротонированная солевая форма, дипротонированная солевая форма, трипротонированная солевая форма, или их смесей. Все такие формы включены в объем настоящего изобретения, если не указано иное.

Настоящее изобретение также включает соединения, меченые изотопами, формулы (I), (II) и (III), т.е., соединения формулы (I), (II) и (III), в которых один или более атомов замещены или обогащены атомом, имеющим такое же атомное число, но атомную массу,

отличную от атомной массы, преобладающей в природе. Примеры изотопов, которые могут быть включены в соединение формулы (I), (II) и (III), включают, без ограничения, ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O и ^{18}O . Особый интерес представляют соединения формулы (I), (II) и (III), обогащенные тритием или углеродом-14, которые можно использовать, например, в исследованиях распределения в тканях. Также особый интерес представляют соединения формулы (I), (II) и (III), обогащенные дейтерием, особенно в месте метаболизма, и ожидается, что эти соединения имеют более высокую метаболическую стабильность. Кроме того, особый интерес представляют соединения формулы (I), (II) и (III), обогащенные изотопом, излучающим позитроны, таким как ^{11}C , ^{15}O и ^{13}N , которые можно использовать, например, в исследованиях позитронно-эмиссионной томографии (PET).

Определения

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

Термин «алкил» означает одновалентную насыщенную углеводородную группу, которая может быть линейной или разветвленной, или их комбинации. Если не указано иное, такие алкильные группы обычно содержат от 1 до 10 атомов углерода. Типичные алкильные группы включают, например, метил (Me), этил (Et), н-пропил (n-Pr) или (nPr), изопропил (i-Pr) или (iPr), н-бутил (n-Bu) или (nBu), втор-бутил, изобутил, трет-бутил (t-Bu) или (tBu), н-пентил, н-гексил, 2,2-диметилпропил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, 2-этилбутил, 2,2-диметилпентил, 2-пропилпентил и т.п.

Если конкретный термин предусматривает определенное количество атомов углерода, количество атомов углерода указано перед этим термином. Например, термин «C₁₋₃алкил» означает алкильную группу, имеющую от 1 до 3 атомов углерода, где атомы углерода находятся в любой химически приемлемой конфигурации, включая линейные или разветвленные конфигурации.

Термин «циклоалкил» означает одновалентную насыщенную карбоциклическую группу, которая может быть моноциклической или полициклической. Если не указано иное, такие циклоалкильные группы обычно содержат от 3 до 10 атомов углерода. Типичные циклоалкильные группы включают, например, циклопропил (cPr), циклобутил (cBu), циклопентил, циклогексил, циклогептил, циклооктил, адамантил и т.п.

Термин «гетероциклил», «гетероцикл», «гетероциклическое» или «гетероциклическое кольцо» означает одновалентную насыщенную или частично ненасыщенную циклическую неароматическую группу, имеющую от 3 до 10 общих кольцевых атомов, причем кольцо содержит от 2 до 9 кольцевых атомов углерода и от 1 до 4 кольцевых гетероатомов, выбранных из азота, кислорода и серы. Гетероциклические группы могут быть моноциклическими или полициклическими (т.е. конденсированными или связанными мостиком). Типичные гетероциклические группы включают, например, пирролидинил, пиперидинил, пиперазинил, имидазолидинил, морфолинил, тиоморфолил,

индолин-3-ил, 2-имидазолинил, тетрагидропиранил, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-2-ил, хинуклидинил, 7-азанорборнанил, нортропанил и т.п., в которых точка присоединения находится на любом доступном кольцевом атоме углерода или азота. Если из контекста очевидна точка присоединения гетероциклической группы, такие группы могут альтернативно называться невалентными разновидностями, т.е., пирролидином, пиперидином, пиперазином, имидазолом, тетрагидропираном и т.д.

Термин «галоген» означает фтор, хлор, бром или йод.

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

Термин «лечащий» или «лечение» означает профилактику, облегчение или подавление медицинского состояния, заболевания или расстройства, которое лечат (например, респираторного заболевания) у пациента (в частности, человека); или облегчение симптомов медицинского состояния, заболевания или расстройства.

Термин «фармацевтически приемлемая соль» означает соль, приемлемую для введения пациенту или млекопитающему, например, человеку (например, соль, имеющую приемлемую безопасность для млекопитающих при данном режиме дозирования). Типичные фармацевтически приемлемые соли включают соли уксусной, аскорбиновой, бензолсульфоновой, бензойной, камфорсульфоновой, лимонной, этансульфоновой, эдисиловой, фумаровой, гентизиновой, глюконовой, глюкуроновой, глутаминовой, гиппуровой, бромистоводородной, хлористоводородной, изетионовой, молочной, лактобионовой, малеиновой, яблочной, мандальной, метансульфоновой, муциновой, нафталинсульфоновой, нафталин-1,5-дисульфоновой, нафталин-2,6-дисульфоновой, никотиновой, азотной, оротовой, памоиновой, пантотеновой, фосфорной, янтарной, серной, винной, п-толуолсульфоновой и ксинафоевой кислоты и т.п.

Термин «его соль» означает соединение, образованное, когда водород кислоты заменен катионом, таким как катион металла или катион органического соединения и т.п. Например, катион может быть протонированной формой соединения формулы (I), (II) или (III), т.е., формой, в которой одна или более аминогрупп протонированы кислотой. Обычно соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль, хотя это не является требованием для солей промежуточных соединений, которые не предназначены для введения пациенту.

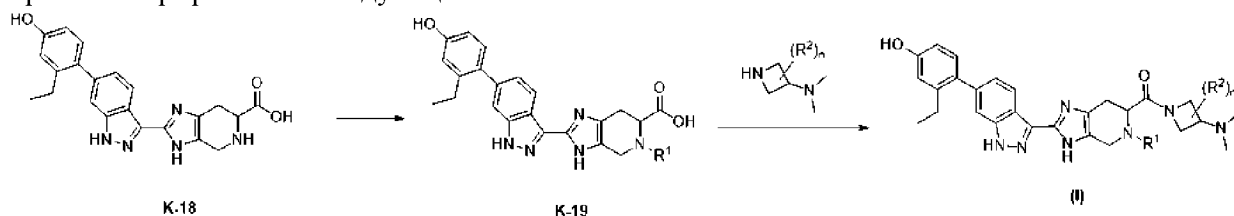
Общие процедуры синтеза

Соединения по настоящему изобретению и их промежуточные соединения могут быть получены в соответствии со следующими общими способами и процедурами с использованием коммерчески доступных или обычно получаемых исходных материалов и реагентов. Заместители и переменные (например, R^1 , R^2 , n и т.д.), используемые в приведенных ниже схемах, имеют те же значения, которые определены в любом месте настоящего описания, если не указано иное. Кроме того, соединения, содержащие кислотный или основной атом или функциональную группу, могут быть использованы

или могут быть получены в виде соли, если не указано иное (в некоторых случаях использование соли в конкретной реакции требует, перед проведением этой реакции, превращения соли в несольевую форму, например свободное основание, с помощью обычных процедур).

Хотя конкретный вариант осуществления настоящего изобретения может быть показан или описан в приведенных ниже процедурах, специалистам в данной области техники будет понятно, что другие варианты осуществления или аспекты настоящего изобретения также могут быть получены с помощью таких процедур или с помощью других методов, реагентов и исходных материалов, известных специалистам в данной области. В частности, следует понимать, что соединения по настоящему изобретению могут быть получены различными способами, в которых реагенты объединяют в разном порядке для получения разных промежуточных продуктов в ходе получения конечных продуктов.

Общий способ получения конечных соединений по изобретению проиллюстрирован на следующей схеме.



Соединение K-18 реагирует с кетоном или альдегидом в присутствии восстанавливающего агента с получением соединения формулы K-19. Затем осуществляют взаимодействие соединения K-19 с замещенным азетином в типичных условиях образования амидной связи с получением соединения (I). Обычно карбоновая кислота контактирует с примерно 1-4 эквивалентами замещенного азетидина в присутствии избытка основания. В реакции образования амидной связи могут использоваться агенты сочетания, такие как N,N,N',N'-тетраметил-О-(7-азабензотриазол-1-ил)урония гексафторфосфат (НАТУ) или другие агенты, используемые в реакции сочетания амидов, известные в данной области. Для удаления нежелательных побочных продуктов может быть добавлен гидразин. Реакцию обычно проводят при комнатной температуре в течение от примерно 5 минут до примерно 24 часов или до тех пор, пока реакция практически не завершится.

Фармацевтические композиции

Соединения по настоящему изобретению и их фармацевтически приемлемые соли обычно используются в форме фармацевтической композиции или состава. Такие фармацевтические композиции можно преимущественно вводить пациенту путем ингаляции. Кроме того, фармацевтические композиции можно вводить любым приемлемым способом введения, включая, без ограничения, пероральный, ректальный, назальный, местный (включая трансдермальный) и парентеральный способы введения.

Соответственно, в одном из аспектов, относящихся к композиции, изобретение

предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество и соединение формулы (I), (II) или (III), где, как определено выше, «соединение формулы (I), (II) или (III)» означает соединение формулы (I), (II) или (III) или его фармацевтически приемлемую соль. Необязательно, такие фармацевтические композиции могут содержать, при необходимости, другие терапевтические агенты и/или агенты для приготовления составов. При обсуждении композиций и их применений «соединение по изобретению» также может упоминаться в настоящем описании как «активный агент». Используемый в настоящем описании термин «соединение по изобретению» включает все соединения, охваченные формулой (I), а также виды, охватываемые формулой (I) и их фармацевтически приемлемые соли.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению обычно содержат терапевтически эффективное количество соединения по настоящему изобретению. Однако специалистам в данной области понятно, что фармацевтическая композиция может содержать больше, чем терапевтически эффективное количество, т.е. нерасфасованные композиции, или меньше, чем терапевтически эффективное количество, т.е. отдельные единичные дозы, предназначенные для многократного введения для достижения терапевтически эффективного количества.

Обычно такие фармацевтические композиции могут содержать от примерно 0,01 до примерно 95% по массе активного агента; включая, например, от примерно 0,05 до примерно 30% по массе; и от примерно 0,1% до примерно 10% по массе активного агента.

В фармацевтических композициях по изобретению можно использовать любой традиционный носитель или вспомогательное вещество. Выбор конкретного носителя или вспомогательного вещества, или комбинации носителей или вспомогательных веществ будет зависеть от способа введения, используемого для лечения конкретного пациента, или типа медицинского состояния или тяжести заболевания. В этом отношении приготовление подходящей фармацевтической композиции для конкретного режима введения находится в пределах компетенции специалистов в области фармацевтики. Кроме того, носители или вспомогательные вещества, используемые в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, являются коммерчески доступными. В качестве дополнительной иллюстрации традиционные методы приготовления составов описаны в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000); и H.C. Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999).

Репрезентативные примеры материалов, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, включают, без ограничения, следующие: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлоза, такая как микрокристаллическая целлюлоза, и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлоза;

порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; вспомогательные вещества, такие как масло какао и воски для суппозиторий; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновая кислота; апирогенная вода; изотонический физиологический раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; фосфатные буферные растворы; и другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических композициях.

Фармацевтические композиции обычно получают путем тщательного перемешивания активного агента с фармацевтически приемлемым носителем и одним или более необязательными ингредиентами. Затем полученной однородно перемешанной смеси можно придать форму, или эту смесь загрузить в таблетки, капсулы, пилюли и т.п. с помощью обычных процедур и оборудования.

В одном из аспектов фармацевтическая композиция подходит для ингаляционного введения. Фармацевтические композиции для ингаляционного введения обычно находятся в форме аэрозоля или порошка. Такие композиции обычно вводят с помощью ингаляционных устройств для доставки, таких как ингалятор сухого порошка (DPI), дозирующий ингалятор (MDI), небулайзерный ингалятор или аналогичное устройство для доставки.

В конкретном варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят путем ингаляции с помощью ингалятора сухого порошка. Такие ингаляторы сухого порошка обычно вводят фармацевтическую композицию в виде сыпучего порошка, который диспергируется в воздушном потоке во время вдоха пациента. Для получения композиции легкосыпучего порошка терапевтический агент обычно готовят с подходящим вспомогательным веществом, таким как лактоза, крахмал, маннит, декстроза, полимолочная кислота (PLA), сополимер полилактида с гликолидом (PLGA) или их комбинациями. Обычно терапевтический агент измельчают и комбинируют с подходящим носителем с образованием композиции, подходящей для ингаляции.

Типичная фармацевтическая композиция для применения в ингаляторе сухого порошка включает лактозу и соединение по настоящему изобретению в микронизированной форме. Такая композиция в виде сухого порошка может быть получена, например, путем объединения сухой измельченной лактозы с терапевтическим агентом и затем сухого смешивания компонентов. Затем композицию обычно загружают в дозатор сухого порошка или в ингаляционные картриджи или капсулы для использования с устройством доставки сухого порошка.

Устройства доставки ингаляционного сухого порошка, подходящие для введения терапевтических агентов путем ингаляции, описаны в данной области техники, и примеры таких устройств являются коммерчески доступными. Например, типичные устройства или продукты для доставки ингаляционного сухого порошка включают Aeolizer (Novartis);

Airmax (IVAX); ClickHaler (Innovata Biomed); Diskhaler (GlaxoSmithKline); Diskus/Accuhaler (GlaxoSmithKline); Ellipta (GlaxoSmithKline); Easyhaler (Orion Pharma); Eclipse (Aventis); FlowCaps (Hovione); Handihaler (Boehringer Ingelheim); Pulvinal (Chiesi); Rotahaler (GlaxoSmithKline); SkyeHaler/Certihaler (SkyePharma); Twisthaler (Schering-Plough); Turbuhaler (AstraZeneca); Ultrahaler (Aventis); и т.п.

В другом конкретном варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят путем ингаляции с помощью дозирующего ингалятора. Такие дозирующие ингаляторы обычно выдают отмеренное количество терапевтического агента с помощью сжатого газа-пропеллента. Соответственно, фармацевтические композиции, вводимые с помощью дозирующего ингалятора, обычно содержат раствор или суспензию терапевтического агента в сжиженном пропелленте. Может использоваться любой подходящий сжиженный пропеллент, включая гидрофторалканы (HFA), такие как 1,1,1,2-тетрафторэтан (HFA 134a) и 1,1,1,2,3,3,3-гептафтор-н-пропан, (HFA 227); и хлорфторуглероды, такие как CCl_3F . В конкретном варианте осуществления пропеллент представляет собой гидрофторалканы. В некоторых вариантах осуществления состав гидрофторалкана содержит сорастворитель, такой как этанол или пентан, и/или поверхностно-активное вещество, такое как триолеат сорбитана, олеиновая кислота, лецитин и глицерин.

Типичная фармацевтическая композиция для применения в дозирующем ингаляторе включает от примерно 0,01% до примерно 5% по массе соединения по изобретению; от примерно 0% до примерно 20% по массе этанола; и от примерно 0% до примерно 5% по массе поверхностно-активного вещества; и остальное - пропеллент HFA. Такие композиции обычно готовят путем добавления охлажденного или находящегося под давлением гидрофторалкана в подходящий контейнер, содержащий терапевтический агент, этанол (если присутствует) и поверхностно-активное вещество (если присутствует). Для приготовления суспензии терапевтическое средство тонко измельчают, и затем объединяют с пропеллентом. Затем композицию загружают в аэрозольный баллончик, который обычно является частью дозирующего ингалятора.

Дозирующие ингаляторы, подходящие для введения терапевтических агентов путем ингаляции, описаны в данной области техники, и примеры таких устройств являются коммерчески доступными. Например, типичные устройства или продукты для дозирующих ингаляторов включают систему ингаляции AeroBid (Forest Pharmaceuticals); ингаляционный аэрозоль Atrovent (Boehringer Ingelheim); Flovent (GlaxoSmithKline); ингалятор Maxair (3M); Proventil Inhaler (Schering); ингаляционный аэрозоль Serevent (GlaxoSmithKline); и т.п.

В другом конкретном аспекте фармацевтическую композицию вводят путем ингаляции с помощью небулайзерного ингалятора. Такие небулайзерные устройства обычно создают высокоскоростной воздушный поток, который распыляет фармацевтическую композицию в виде тумана, переносимого в дыхательные пути пациента. Соответственно, при приготовлении состава для применения в небулайзерном

ингаляторе терапевтический агент может быть растворен в подходящем носителе с образованием раствора. В качестве альтернативы терапевтический агент можно измельчить до размера микрочастиц или наночастиц и объединить с подходящим носителем с образованием суспензии.

Типичная фармацевтическая композиция для применения в небулайзерном ингаляторе включает раствор или суспензию, содержащую от примерно 0,05 мкг/мл до примерно 20 мг/мл соединения по настоящему изобретению, и вспомогательные вещества, совместимые с распыляемыми составами. В одном из вариантов осуществления раствор имеет pH от примерно 3 до примерно 8.

Небулайзерные устройства, подходящие для введения терапевтических агентов путем ингаляции, описаны в данной области техники, и примеры таких устройств являются коммерчески доступными. Например, типичные небулайзеры или продукты включают ингалятор Respimat Softmist (Boehringer Ingelheim); систему легочной доставки AERx (Aradigm Corp.); многоразовый небулайзер PARI LC Plus (Pari GmbH); и т.п.

В еще одном аспекте фармацевтические композиции по изобретению могут быть альтернативно приготовлены в дозированной форме, предназначенной для перорального введения. Подходящие фармацевтические композиции для перорального введения могут быть в форме капсул, таблеток, пилюль, лепешек, облаток, драже, порошков, гранул; или в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости; или в виде жидкой эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле; или в виде эликсира или сиропа; и т.п.; каждое из них содержит заданное количество соединения по настоящему изобретению в качестве активного ингредиента.

Когда фармацевтические композиции по изобретению предназначены для перорального введения в твердой лекарственной форме, они обычно содержат активный агент и один или более фармацевтически приемлемых носителей, таких как цитрат натрия или дикальцийфосфат. Необязательно или альтернативно такие твердые лекарственные формы также могут включать: наполнители или экстендеры, связующие, увлажнители, вещества, замедляющие растворение, ускорители абсорбции, увлажняющие средства, абсорбенты, лубриканты, красители и буферные вещества. В фармацевтических композициях по настоящему изобретению также могут присутствовать агенты, контролирующие высвобождение, смачивающие агенты, покрывающие агенты, подсластители, ароматизаторы и отдушки, консерванты и антиоксиданты.

Альтернативные составы также могут включать составы с контролируемым высвобождением, жидкие лекарственные формы для перорального введения, трансдермальные пластыри и парентеральные составы. Обычные вспомогательные вещества и способы приготовления таких альтернативных составов описаны, например, в ссылке Remington, выше.

Приведенные ниже неограничивающие примеры иллюстрируют репрезентативные фармацевтические композиции по настоящему изобретению.

Композиция сухого порошка

Микронизированное соединение формулы (I) (1 г) смешивают с измельченной лактозой (25 г). Затем эту смешанную смесь загружают в отдельные блистеры отслаиваемой блистерной упаковки в количестве, достаточном для обеспечения от примерно 0,1 мг до примерно 4 мг соединения формулы (I) на дозу. Содержимое блистеров вводят с помощью ингалятора сухого порошка.

Композиция сухого порошка

Микронизированное соединение формулы (I) (1 г) смешивают с измельченной лактозой (20 г) с образованием нерасфасованной композиции, имеющей массовое отношение соединения к измельченной лактозе 1:20. Смешанную композицию упаковывают в устройство для ингаляции сухого порошка, способное доставлять от примерно 0,1 мг до примерно 4 мг соединения формулы (I) на дозу.

Композиция для дозирующего ингалятора

Микронизированное соединение формулы (I) (10 г) диспергируют в растворе, полученном растворением лецитина (0,2 г) в деминерализованной воде (200 мл). Полученную суспензию сушат распылением, и затем микронизируют с образованием микронизированной композиции, содержащей частицы со средним диаметром менее примерно 1,5 мкм. Затем микронизированную композицию загружают в картриджи дозирующего ингалятора, содержащие 1,1,1,2-тетрафторэтан под давлением в количестве, достаточном для обеспечения от примерно 0,1 мг до примерно 4 мг соединения формулы (I) на дозу при введении дозирующим ингалятором.

Композиция для небулайзера

Соединение формулы (I) (25 мг) растворяют в растворе, содержащем 1,5-2,5 эквивалента хлористоводородной кислоты, с последующим добавлением гидроксида натрия для доведения значения pH до 3,5-5,5 и 3 мас.% глицерина. Раствор хорошо перемешивают до растворения всех компонентов. Раствор вводят с помощью небулайзера, который обеспечивает от примерно 0,1 мг до примерно 4 мг соединения формулы (I) на дозу.

Полезность

Ингибиторы JAK по настоящему изобретению были разработаны для лечения воспалительных и фиброзных заболеваний дыхательных путей. В частности, соединения были разработаны для обеспечения доставки сильного антицитокинового агента непосредственно к месту воздействия на респираторное заболевание в легких для ограничения системного воздействия.

Было показано, что соединения по настоящему изобретению являются мощными ингибиторами семейства ферментов JAK: JAK1, JAK2, JAK3 и TYK2. Кроме того, соединения 1-6 продемонстрировали сильное ингибирование провоспалительных и профибротических цитокинов. Признано, что противовоспалительный эффект широкого спектра действия ингибиторов JAK может подавлять нормальную функцию иммунных клеток, потенциально приводя к повышенному риску инфекции. Поэтому настоящие соединения оптимизированы для ограничения абсорбции из легких в плазму, таким

образом сводя к минимуму риск иммуносупрессии.

Как описано ниже в экспериментальном разделе, в доклинических исследованиях были получены профили абсорбции и распределения соединений 1-6. Соединения 1-6 были протестированы на мышах и через 5 часов после введения дозы показали высокую концентрацию в легочной ткани и низкий уровень абсорбции в плазму. Было показано, что соединения 1-6 ингибируют действие провоспалительного цитокина IL-13 в ткани легких мыши. В частности, соединения продемонстрировали ингибирование IL-13-индуцированного фосфорилирования STAT6 в ткани легких, что свидетельствует о локальном захвате мишени JAK в легких *in vivo*. Этот эффект наблюдали, когда провоспалительный цитокин IL-13 вводили через 4 часа после введения тестируемого соединения для предоставления дополнительных доказательств его преимущественной задержки в легких.

Было показано, что соединения 1-6 демонстрируют как сильную ингибирующую активность на клеточном уровне, так и то, что они преимущественно задерживаются в легочной ткани. Обширное исследование, проведенное авторами настоящего изобретения, показало, что, хотя можно идентифицировать соединения, которые являются сильнодействующими на клеточном уровне, или соединения, которые преимущественно задерживаются в легких, гораздо труднее обнаружить соединения, обладающие одновременно обеими желательными характеристиками.

Противовоспалительная активность ингибиторов JAK убедительно продемонстрирована на доклинических моделях астмы (Malaviya et al., *Int. Immunopharmacol.*, 2010, 10, 829-836; Matsunaga et al., *Biochem. And Biophys. Res. Commun.*, 2011, 404, 261-267; Kudlacz et al., *Eur. J. Pharmacol*, 2008, 582, 154-161). Цитокины, участвующие в воспалении астмы, которые передают сигнал через путь JAK-STAT, включают IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-13, IL-23, IL-31, IL-27, тимический стромальный лимфопоэтин (TSLP), интерферон- γ (IFN γ) и колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF). Соответственно, предполагается, что соединения по изобретению будут полезными для лечения воспалительных респираторных заболеваний, в частности астмы. Воспаление и легочный фиброз характерны для других респираторных заболеваний, помимо астмы, таких как хроническая обструктивная болезнь легких (COPD), муковисцидоз (CF), пневмонит, интерстициальные заболевания легких (включая идиопатический легочный фиброз), острое повреждение легких, острый респираторный дистресс-синдром, бронхит, эмфизема, облитерирующий бронхиолит и саркоидоз. Поэтому ожидается, что соединения по настоящему изобретению также будут полезны для лечения хронической обструктивной болезни легких, муковисцидоза, пневмонита, интерстициальных заболеваний легких (включая идиопатический легочный фиброз), острого повреждения легких, острого респираторного дистресс-синдрома, бронхита, эмфиземы, облитерирующего бронхиолита и саркоидоза.

Было показано, что соединения 1-6, при сравнении с соответствующими им

фторсодержащими аналогами (соединения от С-1 до С-6), обладают аналогичной активностью JAK. Однако их преимущество заключается в том, что они вызывают значительно более низкий уровень сульфатирования в пути метаболизма, как показано в анализе 5. Это важно, поскольку сульфатирование в пути метаболизма происходит в легких, что может привести к быстрому уменьшению концентрации активного родительского соединения.

Соединения 1-6 по изобретению продемонстрировали ингибирование цитокинов, ассоциированных с воспалением. Следовательно, соединения по настоящему изобретению, по всей видимости, будут полезными для лечения некоторых конкретных респираторных заболеваний, о чем подробно описано ниже.

Эозинофильное воспаление дыхательных путей является характерной чертой заболеваний, которые в совокупности называются эозинофильными заболеваниями легких (Cottin et al., Clin. Chest. Med., 2016, 37(3), 535-56). Эозинофильные заболевания ассоциированы с сигнализацией IL-4, IL-13 и IL-5. Эозинофильные заболевания легких включают инфекции (особенно глистные инфекции), лекарственный пневмонит (вызванный, например, терапевтическими препаратами, такими как антибиотики, фенитоин или триптофан), грибковый пневмонит (например, аллергический бронхолегочный аспергиллез), гиперчувствительный пневмонит и эозинофильный гранулематоз с полиангиитом (ранее известный как синдром Чарга-Стросса). Эозинофильные заболевания легких неизвестной этиологии включают идиопатические острые эозинофильные пневмонии, идиопатические хронические эозинофильные пневмонии, гиперэозинофильный синдром и синдром Леффлера.

Полиморфизм гена IL-6 связан с повышенным уровнем IL-6 и повышенным риском развития легочной артериальной гипертензии (ПАН) (Fang et al., J. Am. Soc. Hypertens., 2017, 11(3), 171-177). В подтверждение роли IL-6 в развитии ПАН, ингибирование цепи gp130 рецептора IL-6 облегчило течение болезни на крысиной модели ПАН (Huang et al., Can. J. Cardiol., 2016, 32(11), 1356.e1-1356.e10).

Цитокины, такие как IFN γ , IL-12 и IL-6, вовлечены в ряд неаллергических заболеваний легких, таких как саркоидоз и лимфангиолейомиоматоз (El-Hashemite et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 2005, 33, 227-230, и El-Hashemite et al., Cancer Res., 2004, 64, 3436-3443). Также было показано, что соединения по настоящему изобретению ингибируют передачу сигналов IL-6 и IFN γ .

Бронхоэктазы и инфильтративные заболевания легких представляют собой заболевания, связанные с хроническим нейтрофильным воспалением.

Патологическая активация Т-клеток имеет решающее значение в этиологии многочисленных респираторных заболеваний. Аутореактивные Т-клетки играют роль в облитерирующем бронхиолите с организующейся пневмонией (также называемом COS). Подобно COS, этиология отторжения легочного трансплантата связана с аберрантной активацией Т-клеток реципиента трансплантированным легким донора. Отторжение легочного трансплантата может произойти на ранней стадии в виде первичной

дисфункции трансплантата (PGD), организующейся пневмонии (OP), острого отторжения (AR) или лимфоцитарного бронхолита (LB), или оно может возникнуть спустя годы после трансплантации легкого в виде хронической дисфункции легочного трансплантата (CLAD). CLAD ранее известная как облитерирующий бронхолит (BO), теперь считается синдромом, который может иметь различные патологические проявления, включая BO, рестриктивную CLAD (rCLAD или RAS) и нейтрофильную дисфункцию аллотрансплантата. Хроническая дисфункция легочного аллотрансплантата (CLAD) является серьезной проблемой при долгосрочном лечении реципиентов легочного трансплантата, поскольку она приводит к постепенной утрате функциональности пересаженного легкого (Gauthier et al., *Curr. Transplant. Rep.*, 2016, 3(3), 185-191). CLAD плохо поддается лечению, и поэтому остается потребность в эффективных соединениях, способных предотвращать или лечить это состояние. Некоторые JAK-зависимые цитокины, такие как $IFN\gamma$ и IL-5, активируются при CLAD и отторжении легочного трансплантата (Berastegui et al., *Clin. Transplant.* 2017, 31, e12898). Более того, высокие уровни хемокинов CXCR3 в легких, таких как CXCL9 и CXCL10, которые находятся ниже JAK-зависимой передачи сигналов IFN, связаны с худшими исходами у пациентов с легочным трансплантатом (Shino et al, *PLOS One*, 2017, 12(7), e0180281). Было показано, что системное ингибирование JAK является эффективным при отторжении трансплантата почки (Vicenti et al., *American Journal of Transplantation*, 2012, 12, 2446-56). Следовательно, ингибиторы JAK могут быть эффективными при лечении или профилактике отторжения легочного трансплантата и CLAD. Аналогичные события активации Т-клеток, описанные в качестве основной причины отторжения легочного трансплантата, также считаются основной причиной болезни «трансплантат против хозяина» (GVHD), которая может развиваться после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Подобно CLAD, GVHD легких является хроническим прогрессирующим заболеванием с чрезвычайно неблагоприятными исходами, и в настоящее время отсутствует одобренное лечение. В ретроспективном многоцентровом исследовании 95 пациентов с острой или хронической GVHD, резистентной к стероидам, которые получали системный ингибитор JAK руксолитиниб в качестве вспомогательной терапии, большинство пациентов продемонстрировало полный или частичный ответ на руксолитиниб, включая пациентов с GVHD легких (Zeiser et al, *Leukemia*, 2015, 29, 10, 2062-68). Поскольку системное ингибирование JAK связано с серьезными побочными эффектами и небольшим терапевтическим индексом, сохраняется потребность в ингалируемом несистемном ингибиторе JAK, направленном на легкие, для профилактики и/или лечения отторжения легочного трансплантата или GVHD легких. Соединения по изобретению обладают характеристиками, необходимыми для удовлетворения этой потребности. Совсем недавно в связи с более широким применением ингибиторов иммунных контрольных точек появился пневмонит, индуцированный ингибиторами иммунных контрольных точек, еще одно заболевание легких, опосредованное Т-клетками. У онкологических больных, получающих эти агенты, стимулирующие Т-летки, может развиваться пневмонит,

приводящий к летальному исходу.

Анализ реакции смешанной культуры лимфоцитов представляет собой анализ *in vitro*, имитирующий отторжение трансплантата. Было показано, что соединение 1 эффективно ингибирует секрецию IFN γ .

Таким образом, в одном из аспектов изобретение предоставляет способ лечения респираторного заболевания у млекопитающего (например, человека), при этом способ включает введение млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения по изобретению или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и соединение по изобретению или его фармацевтически приемлемую соль.

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

В одном из аспектов респираторное заболевание представляет собой легочную инфекцию, эозинофильное заболевание, глистную инфекцию, легочную артериальную гипертензию, саркоидоз, лимфангиолейомиоматоз, бронхоэктазию, инфильтративное заболевание легких, лекарственный пневмонит, грибковый пневмонит, аллергический бронхолегочный аспергиллез, гиперчувствительный пневмонит, эозинофильный гранулематоз с полиангиитом, идиопатическую острую эозинофильную пневмонию, идиопатическую хроническую эозинофильную пневмонию, гиперэозинофильный синдром, синдром Леффлера, облитерирующий бронхиолит с организующей пневмонией, острые и хронические отторжения легочных трансплантатов (включая PGD, OP, LB, AR и CLAD, BO, рестриктивный CLAD и нейтрофильную дисфункцию аллотрансплантата), болезнь «легочный трансплантат против хозяина», облитерирующий бронхиолит с организующейся пневмонией, легочную артериальную гипертензию, бронхоэктазию или пневмонит, индуцированный ингибиторами иммунных контрольных точек.

Изобретение также относится к способу лечения астмы у млекопитающего, включающему введение млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения по изобретению или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и соединение по изобретению или его фармацевтически приемлемую соль.

При использовании для лечения астмы соединения по настоящему изобретению обычно вводят в виде однократной суточной дозы или многократных суточных доз, хотя могут использоваться и другие формы введения. Количество активного агента, вводимого на дозу, или общее количество, вводимое в сутки, обычно определяется врачом с учетом соответствующих обстоятельств, включая состояние, подлежащее лечению, выбранный

путь введения, фактически вводимое соединение и его относительную активность, возраст, вес и реакцию отдельного пациента, тяжесть симптомов пациента и т.п.

Изобретение также относится к способу лечения респираторного заболевания (включая, без ограничения, заболевание, раскрытое в настоящем описании) у млекопитающего, причем способ включает введение млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения по изобретению или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и соединение по изобретению или его фармацевтически приемлемую соль.

При использовании для лечения респираторного заболевания (включая, без ограничения, заболевание, раскрытое в настоящем описании) соединения по настоящему изобретению обычно вводят в виде одной суточной дозы или многократных суточных доз, хотя могут использоваться другие формы введения. Количество активного агента, вводимого на дозу, или общее количество, вводимое в сутки, обычно определяется врачом с учетом соответствующих обстоятельств, включая состояние, подлежащее лечению, выбранный путь введения, фактически вводимое соединение и его относительную активность, возраст, вес и реакцию отдельного пациента, тяжесть симптомов пациента и т.п.

В качестве ингибиторов JAK, соединения по настоящему описанию также могут быть полезны для лечения множества других заболеваний. Соединения по настоящему изобретению могут быть полезны при различных воспалительных заболеваниях желудочно-кишечного тракта, которые включают, без ограничения, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит (проктосигмоидит, панколит, язвенный проктит и левосторонний колит), болезнь Крона, коллагенозный колит, лимфоцитарный колит, болезнь Бехчета, глютенную болезнь, колит, индуцированный ингибиторами иммунных контрольных точек, илеит, эозинофильный эзофагит, колит, связанный с болезнью трансплантата против хозяина, и инфекционный колит. Язвенный колит (Reimund et al., *J. Clin. Immunology*, 1996, 16, 144-150), болезнь Крона (Woywodt et al., *Eur. J. Gastroenterology Hepatology*, 1999, 11, 267-276), коллагенозный колит (Kumawat et al., *Mol. Immunology*, 2013, 55, 355-364), лимфоцитарный колит (Kumawat et al., 2013), эозинофильный эзофагит (Weinbrand-Goichberg et al., *Immunol. Res.*, 2013, 56, 249-260), колит, связанный с заболеванием трансплантат против хозяина (Coghill et al., *Blood*, 2001, 117, 3268-3276), инфекционный колит (Stallmach et al., *Int. J. Colorectal Dis.*, 2004, 19, 308-315), болезнь Бехчета (Zhou et al., *Autoimmun. Rev.*, 2012, 11, 699-704), глютенная болезнь (de Nitto et al., *World J. Gastroenterol.*, 2009, 15, 4609-4614), колит, индуцированный ингибиторами иммунных контрольных точек (например, колит, вызванный ингибитором CTLA-4; (Yano et al., *J. Translation. Med.*, 2014, 12, 191), колит, индуцированный ингибитором PD-1 или PD-L1), и илеит (Yamamoto et al., *Dig. Liver Dis.*, 2008, 40, 253-259) характеризуется повышением определенных уровней провоспалительных цитокинов. Поскольку многие провоспалительные цитокины

передают сигнал посредством активации JAK, соединения, описанные в настоящей заявке, могут облегчить воспаление и облегчить симптомы. В частности, соединения по настоящему изобретению могут быть полезны для индукции и поддержания ремиссии язвенного колита, а также для лечения болезни Крона, колита, индуцированного ингибиторами иммунных контрольных точек, и побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта при реакции трансплантат против хозяина. Таким образом, в одном из аспектов настоящее изобретение предоставляет способ лечения воспалительного заболевания желудочно-кишечного тракта у млекопитающего (например, человека), причем способ включает введение млекопитающему соединения по изобретению или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и соединение по изобретению или его фармацевтически приемлемую соль.

Атопический дерматит и другие воспалительные кожные заболевания связаны с повышенным уровнем провоспалительных цитокинов, которые зависят от пути JAK-STAT. Следовательно, соединения по настоящему изобретению или их фармацевтически приемлемые соли могут быть полезными против ряда кожных воспалительных или зудящих состояний, которые включают, без ограничения, атопический дерматит, очаговую алопецию, витилиго, псориаз, дерматомиозит, кожные Т-клеточные лимфомы (Netchiporouk et al., *Cell Cycle* 2014; 13, 3331-3335) и подтипы (синдром Сезари, грибovidный микоз, пагетоидный ретикулез, гранулематозную дряблую кожу, лимфоматоидный папулез, хронический лихеноидный питеириаз, оспенновидный лихеноидный острый парапсориаз, CD30+ кожную Т-клеточную лимфому, вторичную CD30+ кожную крупноклеточную лимфому, немикозные грибovidные CD30- кожные крупноклеточные Т-клеточные лимфомы, плеоморфную Т-клеточную лимфому, лимфому Леннерта, подкожную Т-клеточную лимфому, ангиоцентрическую лимфому, бластную НК-клеточную лимфому), узелковую чесуху, красный плоский лишай, первичный локализованный кожный амилоидоз, буллезный пемфигоид, кожные проявления болезни трансплантат против хозяина, пемфигоид, дискоидную волчанку, кольцевидную гранулему, простой хронический лишай, зуд вульвы/мошонки/перианальной области, склеротический лишай, зуд после герпетической невралгии, плоский лишай и декальвальный фолликулит. В частности, атопический дерматит (Bao et al., *JAK-STAT*, 2013, 2, e24137), очаговая алопеция (Xing et al., *Nat. Med.* 2014, 20, 1043-1049), витилиго (Craiglow et al, *JAMA Dermatol.* 2015, 151, 1110-1112), узловатая чесуха (Sonkoly et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006, 117, 411-417), плоский лишай (Welz-Kubiak et al., *J. Immunol. Res* 2015, ID:854747), первичный локализованный кожный амилоидоз (Tanaka et al., *Br. J. Dermatol.* 2009, 161, 1217-1224), буллезный пемфигоид (Feliciani et al., *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 1999, 12, 55-61), и кожные проявления реакции трансплантат против хозяина (Okiyama et al., *J. Invest. Dermatol.* 2014, 134, 992-1000) характеризуются повышенным уровнем некоторых цитокинов, которые передают сигнал посредством активации JAK. Соответственно, соединения по настоящему изобретению или их фармацевтически

приемлемые соли способны облегчить ассоциированное кожное воспаление или зуд, вызываемые этими цитокинами. В частности, можно ожидать, что соединения по изобретению или их фармацевтически приемлемые соли будут полезны для лечения атопического дерматита и других воспалительных заболеваний кожи. Таким образом, в одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ лечения воспалительного кожного заболевания у млекопитающего (например, человека), включающий нанесение на кожу млекопитающего фармацевтической композиции, содержащей соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтический носитель. В одном из аспектов воспалительное заболевание кожи представляет собой атопический дерматит.

Было показано, что многие глазные заболевания связаны с повышением провоспалительных цитокинов, которые зависят от пути JAK-STAT. Таким образом, соединения по настоящему изобретению или их фармацевтически приемлемые соли могут быть полезны для лечения ряда глазных заболеваний, которые включают, без ограничения, увеит, диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, болезнь сухого глаза, возрастную дегенерацию желтого пятна и атопический кератоконъюнктивит. В частности, увеит (Horai and Caspi, *J. Interferon Cytokine Res.*, 2011, 31, 733-744), диабетическая ретинопатия (Abcouwer, *J. Clin. Cell. Immunol.*, 2013, Suppl 1, 1-12), диабетический макулярный отек (Sohn et al., *American Journal of Ophthalmology*, 2011, 152, 686-694), болезнь сухого глаза (Stevenson et al., *Arch. Ophthalmol.*, 2012, 130, 90-100) и возрастная дегенерация желтого пятна (Knickelbein et al., *Int. Ophthalmol. Clin.*, 2015, 55(3), 63-78) характеризуются повышенным содержанием некоторых провоспалительных цитокинов, которые передают сигнал через путь JAK-STAT. Соответственно, соединения по настоящему изобретению или их фармацевтически приемлемые соли способны облегчить ассоциированное глазное воспаление и отменить прогрессирование заболевания или обеспечить облегчение симптомов. Таким образом, в одном из аспектов настоящее изобретение предоставляет способ лечения глазного заболевания у млекопитающего, при этом способ включает введение в глаз млекопитающего фармацевтической композиции, содержащей соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтический носитель. В одном из аспектов глазное заболевание представляет собой увеит, диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, болезнь сухого глаза, возрастную дегенерацию желтого пятна или атопический кератоконъюнктивит. В одном из аспектов способ включает введение соединения по изобретению или его фармацевтически приемлемой соли путем интравитреальной инъекции. Соединения по изобретению или их фармацевтически приемлемые соли также могут использоваться в комбинации с одним или более соединениями, полезными при глазных заболеваниях.

Соединения по изобретению или их фармацевтически приемлемые соли также могут быть полезны для лечения других заболеваний, таких как другие воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания или рак. Соединения по изобретению или их

фармацевтически приемлемые соли могут быть полезны для лечения одного или более из следующего: артрита, ревматоидного артрита, ювенильного ревматоидного артрита, отторжения трансплантата, ксерофтальмии, псориатического артрита, диабета, инсулинозависимого диабета, заболевания двигательного нейрона, миелодиспластического синдрома, боли, саркопении, кахексии, септического шока, системной красной волчанки, лейкемии, хронического лимфолейкоза, хронического миелоцитарного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, острого миелогенного лейкоза, анкилозирующего спондилита, миелофиброза, В-клеточной лимфомы, гепатоцеллюлярной карциномы, болезни Ходжкина, рака молочной железы, множественной миеломы, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легкого, светлоклеточной карциномы яичников, опухоли яичников, опухоли поджелудочной железы, истинной полицитемии, синдрома Шегрена, саркомы мягких тканей, саркомы, спленомегалии, Т-клеточной лимфомы и большой талассемии.

Комбинированная терапия

Соединения по изобретению или их фармацевтически приемлемые соли могут применяться в комбинации с одним или более агентами, которые действуют по одному и тому же механизму или по другим механизмам, для лечения заболевания. Различные агенты можно вводить последовательно или одновременно, в отдельных композициях или в одной композиции. Полезные классы агентов для комбинированной терапии включают, без ограничения, агонист бета2-адренорецепторов, антагонист мускариновых рецепторов, агонист глюкокортикоидов, антагонист рецептора-44, связанного с G-белком, антагонист лейкотриеновых D4-рецепторов, антагонист мускаринового рецептора M3, антагонист гистаминового H1-рецептора, антагонист иммуноглобулина E, ингибитор PDE 4, антагонист IL-4, антагонист мускаринового рецептора M1, антагонист гистаминового рецептора, антагонист IL-13, антагонист IL-5, ингибитор 5-липоксигеназы, агонист бета-адренорецепторов, антагонист хемокина CCR3, стимулятор CFTR, модулятор иммуноглобулина, ингибитор лиганда интерлейкина 33, ингибитор PDE 3, ингибитор дельта изоформы фосфоинозитид-3-киназы, антагонист тромбксана A2, ингибитор эластазы ингибитор тирозинкиназы Kit, антагонист лейкотриена E4, антагонист лейкотриена, антагонист PGD2, ингибитор лиганда TNF-альфа, TNF-связывающий агент, ингибитор каскада комплемента, ингибитор лиганда эотаксина, ингибитор глутатионредуктазы, антагонист гистаминового H4-рецептора, антагонист IL-6, стимулятор гена IL2, модулятор рецептора IIb Fc-области гамма-иммуноглобулина, лиганд гамма-интерферона, ингибитор лиганда интерлейкина-13, ингибитор лиганда интерлейкина-17, антагонист L-селектина, ингибитор лейкоцитарной эластазы, антагонист лейкотриена C4, ингибитор лейкотриен-C4-синтазы, мембранный ингибитор аминоксидазы меди, ингибитор металлопротеазы-12, ингибитор металлопротеазы-9, модулятор аллергена клещей, модулятор мускариновых рецепторов, агонист никотинового ацетилхолинового рецептора, ингибитор ядерного фактора каппа B, антагонист p-селектина, ингибитор PDE 5, антагонист рецептора PDGF, ингибитор гамма-

фосфоинозитид-3-киназы, агонист TLR-7, антагонист TNF, ингибитор тирозинкиназы Abl, антагонист ацетилхолинового рецептора, ингибитор кислой хитиназы млекопитающих, агонист рецептора АСТН, модулятор полимеризации актина, антагонист аденозиновых рецепторов A1, стимулятор аденилатциклазы, антагонист адренорецепторов, лиганд адренокортикотропного гормона, ингибитор алкогольдегидрогеназы 5, стимулятор альфа-1-антитрипсина, ингибитор альфа-протеиназы, модулятор андрогеновых рецепторов, стимулятор ангиотензинпревращающего фермента 2, агонист ANP, ингибитор белка Bcr, антагонист бета-1 адренорецепторов, антагонист бета-2 адренорецепторов, модулятор бета-2 адренорецепторов, модулятор бета-амилоида, ингибитор гена BMP10, ингибитор гена BMP15, ингибитор кальциевых каналов, ингибитор катепсина G, ингибитор гена CCL26, модулятор хемокина CCR3, антагонист хемокина CCR4, ингибитор молекулы клеточной адгезии, стимулятор шаперонина, ингибитор хитиназы, антагонист коллагена I, ингибитор комплемента C3, антагонист CSF-1, антагонист хемокина CXCR2, модулятор общей бета-цепи цитокиновых рецепторов, стимулятор цитотоксического Т-лимфоцитарного белка-4, стимулятор дезоксирибонуклеазы I, стимулятор дезоксирибонуклеазы, ингибитор дипептидилпептидазы I, ингибитор ДНК-гиразы, модулятор простаноидного рецептора DP, антагонист E-селектина, ингибитор семейства тирозинкиназных ERBB рецепторов, модулятор эластина, антагонист эндотелина ET-A, антагонист эндотелина ET-B, ингибитор эпоксидгидролазы, антагонист рецептора FGF3, ингибитор тирозинкиназы Fyn, ингибитор фактора транскрипции GATA 3, модулятор глюкозилцерамидазы, модулятор глутаматного рецептора, ингибитор лиганда GM-CSF, стимулятор гуанилатциклазы, ингибитор $H^+ K^+$ АТФазы, модулятор гемоглобина, агонист гепарина, ингибитор гистоновой деацетилазы, стимулятор гистоновой деацетилазы-2, ингибитор HMG CoA редуктазы, ингибитор I-каппа B бета-киназы, ингибитор гена ICAM1, антагонист IL-17, модулятор рецептора IL-17, антагонист IL-23, модулятор рецептора IL-4, модулятор иммуноглобулина G, агонист иммуноглобулина G1, модулятор иммуноглобулина G1, антагонист рецептора Ia Fc-области эpsilon-иммуноглобулина, антагонист рецептора IIb Fc-области gamma-иммуноглобулина, модулятор каппа-цепи иммуноглобулина, сенситизатор инсулина, лиганд интерферона бета, антагонист интерлейкин 1 рецептор подобного белка, ингибитор лиганда интерлейкина 18, антагонист рецептора интерлейкина 17A, ингибитор лиганда интерлейкина-1 бета, ингибитор лиганда интерлейкина 5, ингибитор лиганда интерлейкин-6, ингибитор KCNA потенциал-зависимого калиевого канала-3, ингибитор лиганда Kit, агонист ламинина-5, антагонист лейкотриеновых рецепторов CysLT1, антагонист лейкотриеновых рецепторов CysLT2, ингибитор гена LOXL2, ингибитор тирозинкиназы Lyn, ингибитор протеина MARCKS, ингибитор MDR-ассоциированного протеина 4, модулятор металлопротеазы-2, модулятор металлопротеазы-9, антагонист минералокортикоидного рецептора, антагонист мускаринового рецептора M2, антагонист мускаринового рецептора M4, антагонист мускаринового рецептора M5, агонист натрийуретического пептидного рецептора A, модулятор рецептора естественных клеток-киллеров, стимулятор субъединицы альфа-7

никотинового ACh рецептора, модулятор рецептора NK-клеток, модулятор ядерного фактора каппа В, агонист рецептора опиоидного фактора роста, ингибитор Р-гликопротеина, антагонист пуриноцептора P2X3, ингибитор MAP-киназы p38, модулятор пептидазы 1, ингибитор фосфолипазы A2, ингибитор фосфолипазы C, ингибитор активатора плазминогена типа 1, антагонист рецептора фактора активации тромбоцитов, агонист PPAR гамма, агонист простациклина, ингибитор протеинтирозинкиназы, стимулятор SH2 домена инозитолфосфатазы 1, ингибитор сигнала трансдукции, ингибитор натриевых каналов, модулятор STAT-3, ингибитор антигена-1 стволовых клеток, модулятор супероксиддисмутазы, ингибитор CD28 поверхностного гликопротеина Т-клеток, ингибитор CD8 поверхностного гликопротеина Т-клеток, агонист TGF-бета, антагонист TGF-бета, ингибитор тромбоксансинтетазы, ингибитор лиганда тимического стромального лимфопротеина, агонист тимозина, лиганд тимозина бета 4, агонист TLR-8, агонист TLR-9, стимулятор гена TLR9, ингибитор топоизомеразы IV, стимулятор тропонина I быстрых скелетных мышц, стимулятор тропонина Т быстрых скелетных мышц, антагонист рецептора IL-1 типа I, модулятор рецептора TNF типа II, модулятор ионного канала, стимулятор утероглобина и агонист VIP.

Конкретные агенты, которые можно применять в комбинации с соединениями-ингибиторами JAK по настоящему изобретению, включают, без ограничения, ацетат росиптора, бромид умеклидиния, секукинумаб, ацетат метенкефалина, ацетат тридекактида, флутиказона пропионат, альфа-циклодекстрин-стабилизированный сульфорафан, тезепелумаб, мометазона фуруат, BI-1467335, дупилумаб, аклидиний, формотерол, AZD-1419, HI-1640V, ривипансел, CMP-001, маннит, ANB-020, омализумаб, трегализумаб, митизакс, бенрализумаб, голимумаб, рофлумаил, иматиниб, REGN-3500, мазитиниб, апремиласт, RPL-554, астиммун, адалимумаб, рупатадин, парогрелил, МК-1029, беклометазона дипропионат, формотерола фумарат, могамулизумаб, сератродаст, UCSB-4144, немиралисиб, СК-2127107, февипипрант, данитриксин, босентан, абатацепт, ЕС-18, дувелисиб, доципарстат, ципрофлоксацин, сальбутамол HFA, эрдостеин, PrEP-001, недокромил, CDX-0158, сальбутамол, энобосарм, R-TPR-022, лензилумаб, флутиказона фуруат, вилантерола трифенатат, флутиказона пропионат, салметерол, PT-007, PRS-060, реместемцел-L, цитруллин, RPC-4046, оксид азота, DS-102, герилимзумаб, актаир, флутиказона фуруат, умеклидиний, вилантерол, AG-NPP709, гамунекс, инфликсимаб, ампион, акумапимод, канакинумаб, INS-1007, CYP-001, сирукумаб, флутиказона пропионат, меполизумаб, питавастантин, солитромицин, этанерцепт, ивакафтор, анакинра, MPC-300-IV, гликопиррония бромид, аклидиния бромид, FP-025, ризанкизумаб, гликопирроний, формотерола фуморат, адипоцелл, YPL-001, титропия бромид, гликопиррония бромид, индакатерола малеат, андекаликсимаб, олодатерол, эзомепразол, вакцина против пылевого клеща, вакцина против аллергена пыльцы полыни, вamorолон, гефапиксант, ревефенацин, гефитиниб, ReJoin, типелукаст, бедорадрин, SCM-CGH, SHP-652, RNS-60, бродалумаб, BIO-11006, умеклидиния бромид, вилантерола трифенатат, ипратропия бромид, тралокинумаб, PUR-1800, VX-561, VX-371, олопатадин,

тулобутерол, формотерола fumarat, триамцинолона ацетонид, резлизумаб, салметерола ксинафоат, флутиказона пропионат, беклометазона дипропионат, формотерола fumarat, тиотропия бромид, лигелизумаб, RUTI, берилизумаб, омализумаб, гликопиррония бромид, SENS-111, деклометазона дипропионат, CHF-5992, LT-4001, индакатерол, гликопиррония бромид, мометазона фуруат, фексофенадин, гликоперрония бромид, азитромицин, AZD-7594, формотерол, CHF-6001, батифентерол, OATD-01, олодатерол, CJM-112, розиглитазон, салметерол, сетипипрант, ингалируемый интерферон бета, AZD-8871, плеканатид, флутиказон, салметерол, моноглицериды эйкозапентаеновой кислоты, лебрикизумаб, RG-6149, QBKPN, мометазон, индакатерол, AZD-9898, пируват натрия, зилеутон, CG-201, имидафенацин, CNTO-6785, CLBS-03, мометазон, RGN-137, прокатерол, формотерол, CCI-15106, POL-6014, индакатерол, беклометазон, MV-130, GC-1112, депо Аллерговак, MEDI-3506, QBW-251, ZPL-389, уденафил, GSK-3772847, левоцетиризин, AXP-1275, ADC-3680, тимапипрант, абедитерол, AZD-7594, ипратропия бромид, сальбутамола сульфат, тадекиниг альфа, ACT-774312, дорназа альфа, илопрост, батифентерол, флутиказона фуруат, аликафорсен, циклезонид, эмерамид, арформотерол, SB-010, озагрел, BTT-1023, дектрекумаб, левальбутерол, пранлукаст, гиалуроновая кислота, GSK-2292767, формотерол, NOV-14, люцинактант, сальбутамол, преднизолон, эбастин, дексаметазона ципецилат, GSK-2586881, BI-443651, GSK-2256294, VR-179, VR-096, hdm-ASIT+, будесонид, GSK-2245035, VTX-1463, эмедастин, декспраимепексол, левальбутерол, N-6022, дексаметазон натрия фосфат, PIN-201104, OPK-0018, TEV-4810, суплатаст, BI-1060469, гемилукаст, гамма-интерферон, далазатид, биластин, флутиказона пропионат, салметерола ксинафоат, RP-3128, бициклохидия бромид, реслизумаб, PBF-680, антагонист CRTH2, пранлукаст, салметерола ксинафоат, флутиказона пропионат, моногидрат тиотропия бромида, мазилукаст, RG-7990, доксофуллин, абедитерол, гликопиррония бромид, TEV-46017, ASM-024, флутиказона пропионат, гликопиррония бромид, салметерола ксинафоат, сальбутамол, TA-270, флинизолид, хромогликат натрия, эпси-гам, ZPL-521, сальбутамол, авиптадил, TRN-157, зафирлукаст, стемпеуцел, пемироласт натрия, надолор, флутиказона пропионат+салметерола ксинафоат, RV-1729, сальбутамола сульфат, диоксид углерода+перфтороктилбромид, APL-1, дектрекумаб+VAK-694, лизина ацетилсалицилат, зилеутон, TR-4, терапия человеческими аллогенными мезенхимальными клетками-предшественниками, полученными из адипоцитов, MEDI-9314, PL-3994, HMP-301, TD-5471, NKTT-120, пемироласт, беклометазона дипропионат, трантинтерол, моносодий-альфа-люминол, IMD-1041, AM-211, TBS-5, ARRY-502, сератродаст, рекомбинантная мидисмаза, ASM-8, дефлазакорт, бамбутерол, RBx-10017609, ипратропиум+фенотерол, флутиказон+формотерол, эпинастин, WIN-901X, VALERGEN-DS, OligoG-COPD-5/20, тулобутерол, оксис Турбухалер, DSP-3025, ASM-024, мизоластин, будесонид+салметерол, LH-011, AXP-E, гистамин+иммуноглобулин человека, YHD-001, теофиллин, амброксол+эрдостеин, раматробан, монтелукаст, пранлукаст, AG-1321001, тулобутерол, ипратропий+сальбутамол, траниласт, метилпреднизолона сулептанат, колфорсина

даропат, репиринат и доксофиллин.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение по изобретению или его фармацевтически приемлемую соль и один или более других терапевтических агентов. Терапевтический агент может быть выбран из класса указанных выше агентов и из списка конкретных агентов, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является подходящей для доставки в легкие. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция подходит для введения путем ингаляции или распыления. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой сухой порошок или жидкую композицию.

Кроме того, в аспекте, относящемся к способу, изобретение предоставляет способ лечения заболевания или расстройства у млекопитающего, включающий введение млекопитающему соединения по изобретению или его фармацевтически приемлемой соли и одного или более других терапевтических агентов.

При применении в комбинированной терапии агенты могут быть приготовлены в одной фармацевтической композиции, или агенты могут быть представлены в отдельных композициях, которые вводят одновременно или в разное время, одним и тем же или разными способами введения. Такие композиции могут быть упакованы отдельно или могут быть упакованы вместе в виде набора. Два или более терапевтических агента в наборе можно вводить одним и тем же способом введения или разными способами введения.

ПРИМЕРЫ

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

ACN=ацетонитрил

DCM=дихлорметан

DIPEA=N,N-диизопропилэтиламин

DMF=N,N-диметилформамид

EtOAc=этилацетат

h=час(ы)

HATU=N,N,N',N'-тетраметил-O-(7-азабензотриазол-1-ил)урония гексафторфосфат

IPA=изопропиловый спирт

IPAc=изопропилацетат

MeOH=метанол

min=минута(ы)

Pd(PPh₃)₄=тетракис(трифенилфосфин)палладий (0)

RT=комнатная температура

TFA=трифторуксусная кислота

THF=тетрагидрофуран

бис(пинаcolato)дифторборан=4,4,5,5,4',4',5',5'-октаметил-
[2,2']би[[1,3,2]диоксабороланил]

Реагенты и растворители приобретали у коммерческих поставщиков (Aldrich, Fluka, Sigma и др.) и использовали без дополнительной очистки. Реакционные смеси контролировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ), аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (анал. ВЭЖХ) и масс-спектрометрии. Реакционные смеси обрабатывали, как конкретно описано для каждой реакции; обычно их очищали экстракцией и другими методами очистки, такими как кристаллизация, в зависимости от температуры и растворителя, а также осаждением. Кроме того, реакционные смеси обычно очищали с помощью колоночной хроматографии или препаративной ВЭЖХ, обычно используя колонки с наполнителем C18 или BDS и обычные элюенты. Типичные условия препаративной ВЭЖХ описаны ниже.

Характеристики продуктов реакции обычно получали методами масс-спектрометрии и ^1H ЯМР. Для анализа ЯМР образцы растворяли в дейтерированном растворителе (таком как CD_3OD , CDCl_3 или $d_6\text{-DMSO}$), и спектры ^1H -ЯМР получали с помощью прибора Varian Gemini 2000 (400 МГц) в стандартных условиях наблюдения. Масс-спектрометрическую идентификацию соединений проводили методом ионизации электрораспылением (ESMS) с помощью прибора Applied Biosystems (Foster City, CA) модели API 150 EX или прибора Waters (Milford, MA) 3100, подключенного к системам автоочистки.

Условия препаративной ВЭЖХ

Колонка: C18, 5 мкм, 21,2x150 мм; или C18, 5 мкм 21x250; или C14, 5 мкм 21x150 мм

Температура колонки: комнатная температура

Скорость потока: 20,0 мл/мин.

Подвижные фазы: A=вода+0,05% TFA

B=ACN+0,05% TFA,

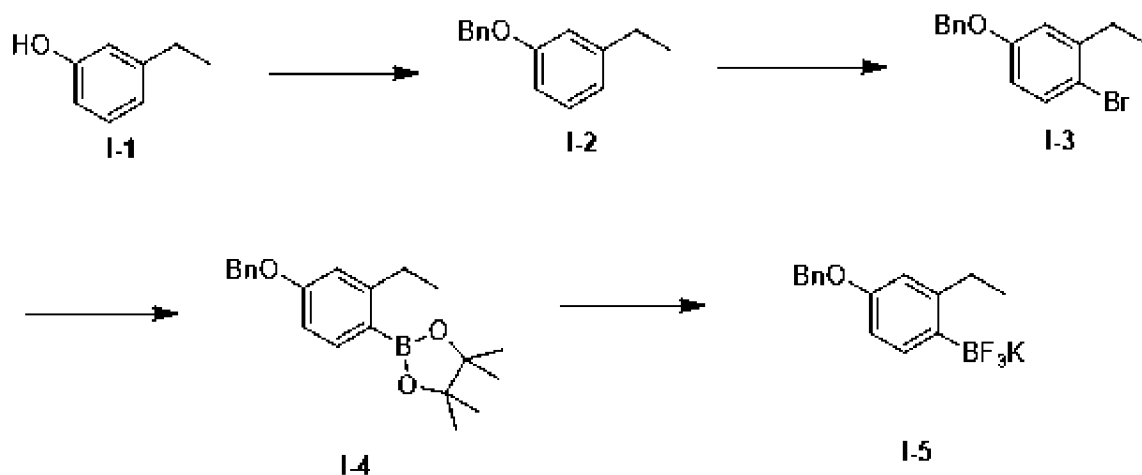
Вводимый объем: (100-1500 мкл)

Длина волны детектора: 214 нм

Неочищенные соединения растворяли в 1:1 смеси вода:уксусная кислота, примерно при 50 мг/мл. 4-минутный тест в аналитическом масштабе выполняли на колонке C18 2,1x50 мм с последующим 15 или 20-минутным пробегом в препаративном режиме с использованием 100 мкл инъекции с градиентом, исходя из % времени удерживания В в тестовом прогоне в аналитическом режиме. Точные градиенты зависели от образца. Образцы с примесями с близким временем пробега проверяли, используя для лучшего разделения колонку C18 21x250 мм и/или колонку C14 21x150 мм. Фракции, содержащие желаемый продукт, идентифицировали с помощью масс-спектрометрического анализа.

Получение 1: 4-(бензилокси)-2-этилфенил)трифтор- λ^4 -боран, калиевая соль I-

5.



(a) 1-(бензилокси)-3-этилбензол (I-2)

К перемешиваемому раствору 3-этилфенола (I-1) (25,0 г, 204,0 ммоль) в ACN (250 мл, 10 объемов) добавляли карбонат калия (42,0 г, 306 ммоль) при комнатной температуре. Полученную реакционную массу перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут, после чего по каплям добавляли бензилбромид (24,0 мл, 204 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивали в течение 6 часов при комнатной температуре. После завершения реакции (контроль по ТСХ) полученную реакционную массу выливали в воду (1,0 л) с последующей экстракцией соединения с помощью EtOAc (2×2 л). Объединенные органические слои промывали холодной водой, рассолом и сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали при пониженном давлении. Затем неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (100-200 М), используя в качестве элюентов 2% EtOAc в гексане, с получением желаемого продукта (I-2) в виде светло-желтого маслянистого соединения (35,0 г, 81%). ^1H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 7,46-7,44 (м, 2H), 7,39 (т, $J=7,6$ Гц, 2H), 7,34-7,31 (м, 1H), 7,21 (т, $J=7,6$ Гц), 6,86-6,80 (м, 3H), 5,07 (с, 2H), 2,64 (кв, $J=7,6$ Гц, 2H), 1,24 (т, $J=7,6$ Гц, 3H).

(b) 4-(бензилокси)-1-бром-2-этилбензол (I-3)

К охлажденному льдом перемешиваемому раствору 1-(бензилокси)-3-этилбензола (I-2) (35,0 г, 164 ммоль) в ACN (525 мл, 15 объемов) порционно добавляли N-бромсукцинимид (32,0 г, 181 ммоль) в течение 15 минут. Полученную реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. После завершения реакции (контроль по ТСХ) полученную реакционную массу выливали в ледяную воду (1,50 л) с последующей экстракцией соединения EtOAc (2×1 л). Объединенные органические слои промывали водой и сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением сырого продукта. К неочищенному материалу добавляли н-гексан (250 мл) с получением суспензии, которую затем фильтровали через шоттовскую воронку. Маточный раствор упаривали при пониженном давлении с получением желаемого продукта I-3 в виде светло-желтого маслянистого соединения (42,0 г, 87%). ^1H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 7,52-7,29 (м, 7H), 6,88 (с, 1H), 6,68 (д, $J=6,0$ Гц, 1H), 5,04 (с, 2H), 2,69 (кв, $J=7,6$ Гц, 2H), 1,20 (т, $J=7,5$ Гц, 3H).

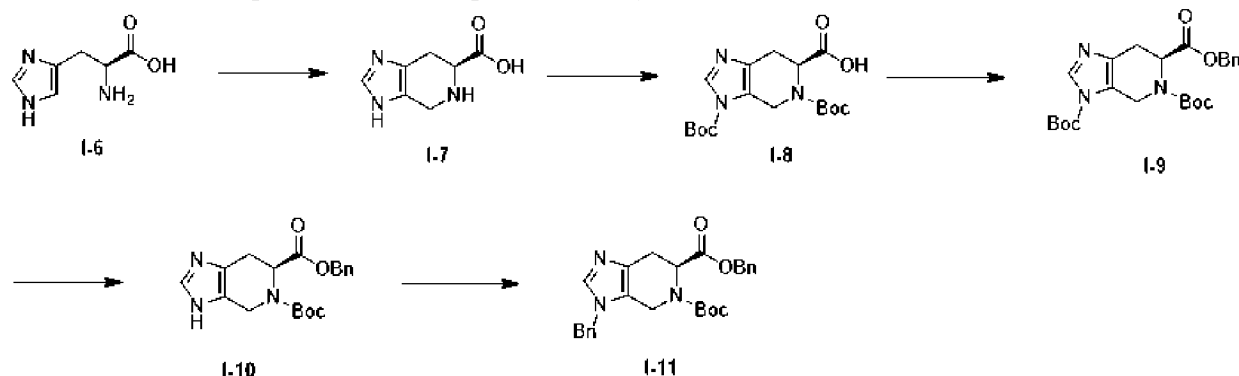
(с) 2-(4-(бензилокси)-2-этилфенил)-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан (I-4)

Перемешиваемый раствор 4-(бензилокси)-1-бром-2-этилбензола (I-3) (42,0 г, 144 ммоль), бис(пинаколато)диборона (44,0 г, 173 ммоль) и ацетата калия (28 г, 288 ммоль) в диоксане (440 мл) дегазировали путем продувки N₂ (газ) в течение 15 мин с последующим добавлением комплекса PdCl₂(dppf).DCM (11,0 г, 15 ммоль). Полученную реакционную смесь нагревали до 80°C в течение следующих 16 часов. После завершения реакции (контроль по ТСХ) реакционную массу фильтровали через слой целита, и маточный раствор упаривали при пониженном давлении с получением сырого продукта. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (100-200 М), используя в качестве элюентов 1% EtOAc в гексане, с получением желаемого продукта (I-4) в виде светло-желтого маслянистого соединения (32,0 г, 66%). ¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 7,74 (д, J=8,4 Гц, 1H), 7,45-7,36 (м, 5H), 6,84-6,78 (м, 2H), 5,08 (с, 2H), 2,91 (кв, J=7,6 Гц), 1,33 (с, 12H), 1,19 (т, J=7,6 Гц, 3H).

(d) (4-(бензилокси)-2-этилфенил)трифтор-λ⁴-боран, калиевая соль (I-5)

К перемешиваемому раствору соединения 2-(4-(бензилокси)-2-этилфенил)-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолана (I-4) (20 г, 59,0 ммоль) в смеси ацетон:метанол (200 мл, соотношение 1:1, 10 объемов) добавляли 3М раствор фтористокислого калия (23,0 г, 295 ммоль, растворенного в 98,0 мл воды). Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. После завершения реакции (контроль по ТСХ) полученную реакционную массу упаривали при пониженном давлении. Полученное таким образом твердое вещество помещали в воду (100 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Полученную реакционную массу фильтровали через шоттовскую воронку, промывали н-гексаном и сушили при пониженном давлении с получением желаемого продукта (I-5) в виде белого твердого вещества (14,0 г, 74%). ¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 7,43 (д, J=7,2 Гц, 2H), 7,37 (т, J=7,5 Гц, 2H), 7,30 (т, J=7,1 Гц, 1H), 7,22 (д, J=8,0 Гц), 6,58 (с, 1H), 6,53 (д, J=7,9 Гц, 1H), 5,00 (с, 2H), 2,65 (кв, J=7,5 Гц, 2H), 1,07 (т, J=7,4 Гц, 3H).

Получение 2: 6-бензил-5-(трет-бутил)-(S)-3-бензил-3,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-c]пиридин-5,6-дикарбоксилат (I-11)



(a) (S)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-c]пиридин-6-карбоновая кислота, гидрохлоридная соль (I-7)

К охлажденной льдом перемешиваемой суспензии L-гистидина (I-6) (5,0 кг, 32,14

моль) в воде (40 л, 8 объемов) по каплям добавляли концентрированную соляную кислоту (3,93 л, 33,75 моль) с последующим добавлением формальдегида (5,50 л, 67,5 моль, 37% водный раствор). Полученный раствор перемешивали в течение 30 минут при той же температуре, и затем нагревали при 80°C в течение 8 часов. Ход реакции контролировали по ЖХМС. Воду удаляли при пониженном давлении, получая сырой продукт, и полученный сырой продукт перемешивали в течение 2 часов в толуоле (20 л). Органические вещества удаляли при пониженном давлении для удаления избытка воды, и соединение азеотропно сушили. Затем полученный материал помещали в диэтиловый эфир (20 л) и перемешивали в течение 2 часов. После этого твердый материал фильтровали и сушили на воздухе с получением желаемого продукта (I-7) в виде не совсем белого твердого вещества (6,50 кг, 85%). ¹H ЯМР (400 МГц, D₂O) δ 8,69 (с, 1H), 4,56 (д, J=15,4 Гц, 1H), 4,42 (д, J=15,5 Гц, 1H), 4,20 (дд, J=5,5, 5,2 Гц, 1H), 3,42 (дд, J=5,0, 17,0 Гц, 1H), 3,11 (дд, J=10,2, 16,8 Гц, 1H).

(b) (S)-3,5-бис(трет-бутоксикарбонил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновая кислота (I-8)

К охлажденному льдом перемешиваемому раствору (S)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновой кислоты дигидрохлорида (I-7) (6,10 кг, 25,40 моль) в 1,4-диоксане (48 л, 8 объемов) и воде (48 л, 8 объемов) по каплям добавляли триэтиламин (12,36 л, 89 моль) с последующим добавлением ди-трет-бутилдикарбоната (18,07 л, 78,74 моль, растворенного в 5 л 1,4-диоксана) в течение 30 мин. Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение следующих 16 часов. После завершения реакции (контроль по ТСХ и ЖХМС) желтоватую реакционную смесь разбавляли водой (10 л) и последовательно промывали диэтиловым эфиром (2×10 л) и EtOAc (2×7,50 л). Органическую фазу отбрасывали. Водный слой охлаждали и доводили до pH ~3 с помощью 6 н раствора HCl; водную фазу экстрагировали EtOAc (3×10 л). Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении. Маслянистый остаток кристаллизовали из смеси 30% EtOAc:гексаны с получением желаемого продукта (I-8) в виде не совсем белого твердого вещества (5,1 кг, 55%). (m/z): [M+H]⁺ вычисленное для C₁₇H₂₅N₃O₆ 368,18, найденное 368,21.

(c) 6-бензил-3,5-ди-трет-бутил-(S)-6,7-дигидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-3,5,6(4H)-трикарбоксилат (I-9)

К охлажденному льдом раствору (S)-3,5-бис(трет-бутоксикарбонил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновой кислоты (I-8) (5,1 кг, 13,88 моль) в DCM (51 л, 10 объемов) последовательно добавляли насыщенный водный бикарбонат натрия (41,0 л, 8 объемов), тетрабутиламмоний йодид (5,13 кг, 13,88 моль) и бензилбромид (2,47 л, 20,82 моль). Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение следующих 16 часов. После завершения реакции (контроль по ТСХ и ЖХМС) двухфазный раствор разделяли. Водный слой экстрагировали DCM (3×10 л). Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над

сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением сырого продукта, который очищали колоночной хроматографией через силикагель (100-200 М), используя в качестве элюентов 40% EtOAc в гексане, с получением желаемого продукта (I-9) в виде вязкого масла (4,50 кг, 72%). (m/z): [M+H]⁺ вычисленное для C₂₄H₃₁N₃O₆ 458,22, найденное 458,60.

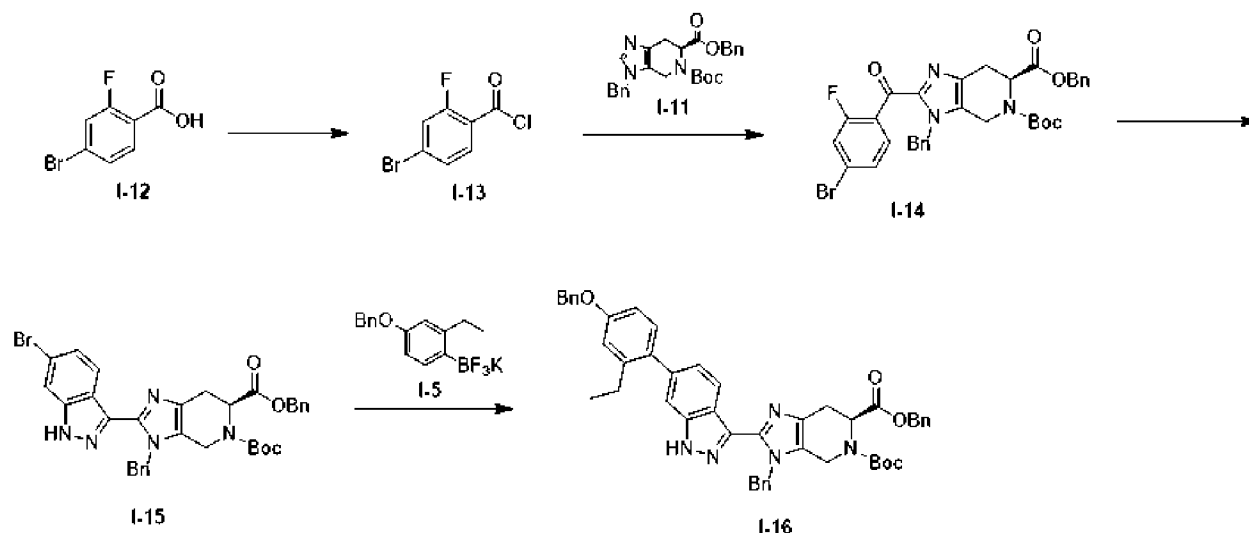
(d) 6-бензил-5-(трет-бутил)-(S)-3,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилат (I-10)

К охлажденному льдом раствору 6-бензил-3,5-ди-трет-бутил-(S)-6,7-дигидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-3,5,6(4H)-трикарбоксилата (I-9) (4,50 кг, 9,84 моль) в IPA (45 л, 10 объемов) по каплям добавляли гидроксид аммония (36 л, 8 объемов). Полученную реакционную смесь дополнительно перемешивали при комнатной температуре в течение следующих 16 часов. После завершения реакции (контроль по ТСХ и ЖХМС) полученную смесь разбавляли водой (25 л) с последующей экстракцией EtOAc (3x20 л). Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением сырого продукта, который очищали колоночной хроматографией через силикагель (100-200 М), используя в качестве элюентов 2% MeOH в DCM, с получением желаемого продукта (I-10) в виде густого вязкого масла (2,70 кг, 77%). (m/z): [M+H]⁺ вычисленное для C₁₉H₂₃N₃O₄ 358,17, найденное 358,33.

(e) 6-бензил-5-(трет-бутил)-(S)-3-бензил-3,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилат (I-11)

К охлажденному льдом раствору 6-бензил-5-(трет-бутил)-(S)-3,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилата (I-10) (2,70 кг, 7,55 моль) в DCM (32,4 л, 12 объемов) добавляли 1 н водный раствор гидроксида натрия (24,3 л, 9 объемов) с последующим последовательным добавлением тетрабутиламмония йодида (2,80 кг, 7,55 моль) и бензилбромид (0,99 л, 8,31 моль). Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение следующих 2 часов. После завершения реакции (контроль по ТСХ и ЖХМС) двухфазный раствор разделяли. Водный слой экстрагировали DCM (3x10 л). Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали колоночной хроматографией на силикагеле (100-200 М), используя в качестве элюентов 40% EtOAc в гексане, с получением желаемого продукта (I-11) в виде вязкого масла (1,70 кг, 63%). (m/z): [M+H]⁺ вычисленное для C₂₆H₂₉N₃O₄ 448,22, найденное 448,20.

Получение 3: 6-бензил-5-(трет-бутил)-(S)-3-бензил-2-(6-(4-(бензилокси)-2-этилфенил)-1H-индазол-3-ил)-3,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилат (I-16)



(а) 4-бром-2-фторбензоилхлорид (I-13)

К охлажденному льдом перемешиваемому раствору 4-бром-2-фторбензойной кислоты (I-12) (1,25 кг, 5,71 моль) в DCM (12,5 л, 15 объемов) по каплям добавляли оксалилхлорид (0,98 л, 11,42 моль). Полученную реакционную смесь перемешивали в течение 10 мин при той же температуре. Затем к реакционной смеси по каплям добавляли DMF (150 мл). Полученной реакционной массе давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 часов. После завершения реакции (контроль по ТСХ) избыток оксалилхлорида удаляли при пониженном давлении в атмосфере азота с получением сырого продукта (I-13) (1,08 кг, 80%), который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

(б) 6-бензил-5-(трет-бутил)-(S)-3-бензил-2-(4-бром-2-фторбензоил)-3,4,6,7-тетрагидро-5Н-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилат (I-14)

К перемешиваемому раствору 6-бензил-5-(трет-бутил)-(S)-3-бензил-3,4,6,7-тетрагидро-5Н-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилата (I-11) (1,70 кг, 3,80 моль) в ACN (13,6 л, 8 объемов) добавляли триэтиламин (2,11 л, 15,2 моль) с последующим добавлением 4-бром-2-фторбензоилхлорида (I-13) (1,08 кг, 4,56 моль в 3,4 л ACN, 2 объема) при комнатной температуре. После завершения добавления светло-желтый цвет полученной реакционной смеси стал коричневым. Полученную реакционную смесь перемешивали при той же температуре в течение 30 мин, и ход реакции контролировали по ТСХ. Полученную реакционную смесь гасили ледяной водой (10 л) с последующей экстракцией EtOAc (3×5 л), и объединенные органические слои промывали солевым раствором. Органические слои сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали колоночной хроматографией на силикагеле (100-200 М), используя в качестве элюентов 20% EtOAc в гексане, с получением желаемого продукта (I-14) (1,74 кг, 71%). (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{33}H_{31}BrFN_3O_5$ 648,14, найденное 648,20.

(с) 6-бензил-5-(трет-бутил)-(S)-3-бензил-2-(6-бром-1H-индазол-3-ил)-3,4,6,7-тетрагидро-5Н-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилат (I-15)

К перемешиваемому раствору 6-бензил-5-(трет-бутил)-(S)-3-бензил-2-(4-бром-2-фторбензоил)-3,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилата (I-14) (1,74 кг, 2,68 моль) в THF (26,0 л, 15 объемов) добавляли гидразин гидрат (0,705 л, 13,4 моль) при комнатной температуре. Полученную реакционную смесь нагревали при 60°C в течение 3 часов. После завершения реакции (контроль по ТСХ) полученную реакционную массу выливали в ледяную воду (10 л) с последующей экстракцией соединения EtOAc (3×10 л). Объединенные органические слои промывали рассолом и сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением сырого продукта, который очищали колоночной хроматографией на силикагеле (100-200 М), используя в качестве элюентов 20% EtOAc в гексане, с получением желаемого продукта (I-15) в виде не совсем белого твердого вещества (1,12 кг, 65%). (m/z): [M+H]⁺ вычисленное для C₃₃H₃₂BrN₅O₄ 642,16, найденное 642,21.

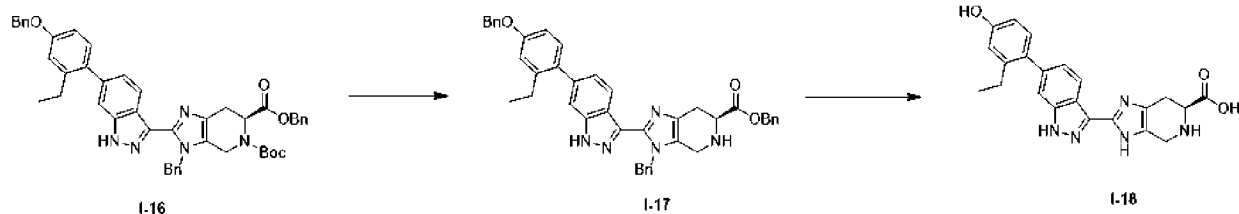
(d) 6-бензил-5-(трет-бутил)-(S)-3-бензил-2-(6-(4-(бензилокси)-2-этилфенил)-1H-индазол-3-ил)-3,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилат (I-16)

Бис(пинаколато)диборон (250 г, 984 ммоль) загружали в трехгорлую одностенную колбу объемом 5 л, предварительно протравленную фтористыми соединениями, вместе с пропан-2-олом (1882 мл, 2,46E+04 ммоль), и смесь перемешивали до полного растворения. Растворение было эндотермическим (-4°C). В 4 л колбе Эрленмейера, предварительно протравленной фтористыми соединениями, растворяли в воде (2,306 л, 1,28E+05 ммоль) гидрофторид фторида калия (538 г, 6891 ммоль) с образованием 3М раствора. Растворение было эндотермическим (-12°C). Затем раствор фильтровали для удаления из гидрофторида фторида калия небольшого количества нерастворенного материала. Как только оба раствора полностью растворились, содержимое колбы Эрленмейера порционно загружали в одностенную колбу в течение 15 минут. Наблюдали умеренный экзотермический эффект (+10°C). Во время добавления раствор превратился в густую и светопроницаемую полупрозрачную серую суспензию, и перемешивание усиливали для поддержания содержимого в хорошо перемешанном состоянии. Смесь перемешивали в течение 1,5 ч, и затем фильтровали через пористую стеклянную воронку (4 л, предварительно протравленную). Для завершения фильтрации потребовалось 30-45 минут. Прозрачный двухфазный фильтрат отбрасывали. Белое твердое вещество сушили на фильтре в течение 10 минут (наблюдали растрескивание лепешки). Твердые вещества переносили обратно в очищенную 5 л трехгорлую одностенную колбу и ресуспендировали в воде (1,33 л, 7,38E+04 ммоль). Суспензию перемешивали в течение 2 ч, в результате чего образовался прозрачный гомогенный гидрогель. Раствор перемешивали в течение 1 ч, после этого твердые вещества/гель отфильтровывали с использованием 4 л стеклянной воронки грубой фильтрации (предварительно протравленной). Твердым веществам давали высохнуть на фильтре в течение 30 минут. Твердые вещества переносили обратно в очищенную 5 л трехгорлую одностенную колбу и ресуспендировали в ацетоне (1,084 л, 1,48E+04 ммоль). Бело-серую суспензию перемешивали в течение 1 ч, и затем фильтровали на 4 л стеклянной воронке грубой

фильтрации (предварительно протравленной). Для завершения фильтрации потребовалось 20 минут, и затем выполняли сушку на воронке в течение еще 1 часа. В течение этого времени твердые вещества время от времени перемешивали для обеспечения однородной сушки. После высыхания на фильтре остался светло-белый порошок. Твердые вещества сушили в течение 20 часов при 55°C под вакуумом в медленном потоке азота с получением рыхлого белого твердого вещества (было собрано 200,3 г).

К перемешиваемому раствору 6-бензил-5-(трет-бутил)-(S)-3-бензил-2-(6-бром-1H-индазол-3-ил)-3,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилата (I-15) (10,0 г, 16,0 ммоль) в 2-метилтетрагидрофуране (100 мл, 10 объемов) добавляли (4-(бензилокси)-2-этилфенил)трифтор- λ^4 -боран, калиевую соль (I-5) (8,0 г, 20 ммоль) и полученное выше рыхлое белое твердое вещество (0,20 г). Полученную реакционную смесь дегазировали азотом в течение 30 минут. К этому раствору добавляли приготовленный водный раствор карбоната цезия (20,0 г, 62,0 ммоль в 60 мл воды, 6 объемов). Полученную реакционную смесь дополнительно дегазировали в течение 15 минут с последующим добавлением бис(ди-трет-бутил(4-диметиламинофенил)фосфин)дихлорпалладия (II) (0,66 г, 0,93 ммоль), и реакционную смесь вакуумировали и промывали азотом. Полученную реакционную смесь нагревали при 110°C в течение 20 часов. После завершения реакции (контроль ТСХ и ЖХМС) полученную реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через слой целита, затем дополнительно промывали EtOAc (3×0,5 л). Объединенные органические слои промывали 1 н раствором гидроксида натрия (3×0,5 л). Затем объединенные органические слои промывали рассолом и сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали при пониженном давлении, получая сырой продукт, который очищали колоночной хроматографией на силикагеле (100-200 М), используя в качестве элюентов 20% EtOAc в гексане, с получением желаемого продукта (I-16) (в виде смеси N-бензил-региоизомеров) в виде светло-желтого твердого вещества (8,0 г, 66%). (m/z): [M+H]⁺ вычисленное для C₄₈H₄₇N₅O₅ 774,36, найдено 774,59.

Получение 4: (S)-2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновая кислота, гидрохлорид (I-18)



(а) бензил-(S)-3-бензил-2-(6-(4-(бензилокси)-2-этилфенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоксилат, гидрохлорид (I-17)

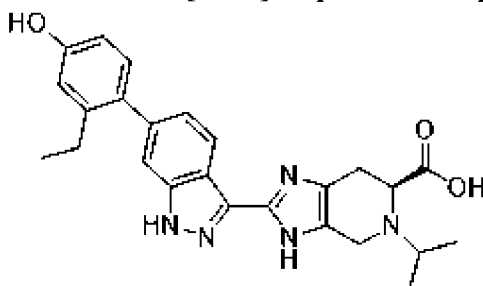
6-Бензил-5-(трет-бутил)-(S)-3-бензил-2-(6-(4-(бензилокси)-2-этилфенил)-1H-индазол-3-ил)-3,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилат (I-16) (1,0 г, 1,292 ммоль) растворяли в диоксане (8 мл) и воде (1,5 мл), затем добавляли 4М раствор хлорида водорода в диоксане (7 мл, 28,0 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при

комнатной температуре в течение 3 часов (ход реакции контролировали по ЖХМС). Затем реакционную смесь замораживали и лиофилизировали, и неочищенный продукт (I-17) сразу использовали в следующей реакции (предполагаемый количественный выход). (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{43}H_{39}N_5O_3$ 674,31, найденное 674,3.

(b) (S)-2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновая кислота, гидрохлорид (I-18)

Бензил-(S)-3-бензил-2-(6-(4-(бензилокси)-2-этилфенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоксилат, гидрохлорид (I-17) (0,918 г, 1,292 ммоль) растворяли в 2-пропаноле (15 мл), 5 М растворе хлористого водорода в воде (0,258 мл, 1,292 ммоль) и воде (0,25 мл) при 50°C, затем добавляли палладий 10 мас.% на угле, 50% воды (0,138 г, 0,065 ммоль). Затем реакционную колбу продували азотом, присоединяли баллон с водородом, и реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 4 дней, при необходимости пополняя баллон водородом (ход реакции контролировали по ЖХМС). Затем все твердые вещества удаляли фильтрацией, и полученный раствор концентрировали. Остаток растворяли в смеси ACN/вода 1:1, замораживали и лиофилизировали. Полученный порошок (I-18) использовали без дополнительной очистки (предполагаемый количественный выход). (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{22}H_{21}N_5O_3$ 404,17, найденное 404,2.

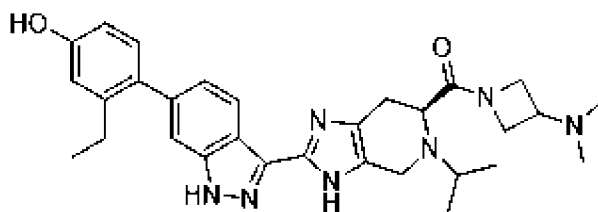
Получение 5: (S)-2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с] пиридин-6-карбоновая кислота (I-19)



I-19

(S)-2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновую кислоту, HCl (I-18) (0,25 г, 0,568 ммоль) суспендировали в DMF (2,5 мл) и ацетоне (2,5 мл), затем уксусной кислоте (0,098 мл, 1,705 ммоль) и цианоборгидриде натрия (0,179 г, 2,84 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов (ход реакции контролировали по ЖХМС). Реакционную смесь концентрировали, затем неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой хроматографией (градиент 5-70% ACN/вода, колонка 50 г C18aq) с получением соли TFA указанного в заголовке соединения (149 мг, выход 47%). (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{25}H_{27}N_5O_3$ 446,21, найденное 446,3.

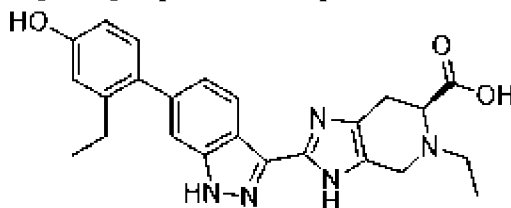
Пример 1: (S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-ил) метанон



1

(S)-2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновую кислоту, TFA (I-19) (50 мг, 0,089 ммоль), 3-(диметиламино)азетидина дигидрохлорид (23,20 мг, 0,134 ммоль) и DIPEA (0,078 мл, 0,447 ммоль) растворяли в DMF (1,5 мл), затем добавляли HATU (51,0 мг, 0,134 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов (ход реакции контролировали по ЖХМС). Для расщепления нежелательных побочных продуктов добавляли гидразин (0,014 мл, 0,447 ммоль), и раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем реакционную смесь концентрировали, и неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (градиент 5-70% ACN/вода, колонка C18) с получением соли TFA указанного в заголовке соединения (25 мг, выход 37%). (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{30}H_{37}N_7O_2$ 528,30, найденное 528,3. 1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 13,09 (с, 1H), 9,40 (с, 1H), 8,27 (д, J=8,31, 1H), 7,30 (с, 1H), 7,04 (м, 2H), 6,71 (д, J=2,54, 1H), 6,64 (дд, J=2,53, 8,26, 1H), 4,26 (м, 1H), 4,06 (м, 2H), 3,82 (м, 2H), 3,64 (м, 2H), 3,03 (м, 2H), 2,74 (м, 2H), 2,47 (кв, J=7,56, 2H), 2,07 (д, J=3,69, 6H), 1,07 (м, 6H), 1,00 (т, J=7,50, 3H).

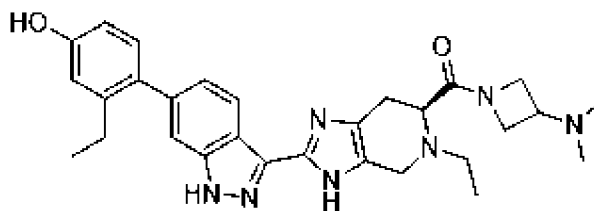
Получение 6: (S)-5-этил-2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновая кислота



(S)-2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновую кислоту, HCl (0,100 г, 0,227 ммоль) (I-18) и ацетальдегид (0,019 мл, 0,341 ммоль) растворяли в метаноле (3,0 мл), затем добавляли цианоборгидрид натрия (0,057 г, 0,909 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов (ход реакции контролировали по ЖХМС). Для гашения любого оставшегося ацетальдегида добавляли боргидрид натрия (9 мг, 0,227 ммоль), затем реакционную смесь концентрировали. Затем неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой хроматографией (градиент 5-70% ACN/вода, 40 г колонка C18) с получением соли TFA указанного в заголовке соединения (62 мг, выход 50%). (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{24}H_{25}N_5O_3$ 432,20, найденное 432,1.

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

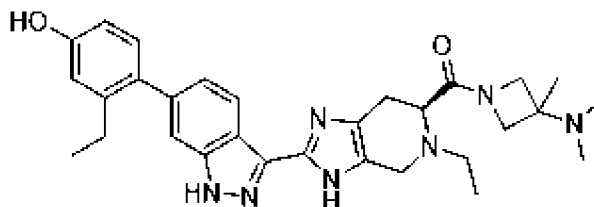
ил)метанон



2

(S)-5-этил-2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновую кислоту, TFA (30 мг, 0,055 ммоль), 3-(диметиламино)азетидина дигидрохлорид (14,28 мг, 0,082 ммоль) и DIPEA (0,048 мл, 0,275 ммоль) растворяли в DMF (1,50 мл), затем добавляли HATU (31,4 мг, 0,082 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа (ход реакции контролировали по ЖХМС). Для расщепления нежелательных побочных продуктов добавляли гидразин (5,18 мкл, 0,165 ммоль), затем раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут. После этого реакционную смесь концентрировали, и неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (градиент 5-60% ACN/вода, колонка C18) с получением соли TFA указанного в заголовке соединения (25 мг, выход 63%). (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{29}H_{35}N_7O_2$ 514,29, найденное 514,2.

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

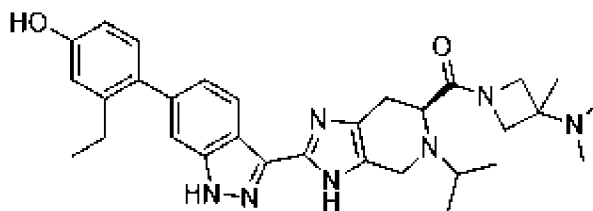


3

(S)-5-этил-2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновую кислоту, TFA (30 мг, 0,055 ммоль), N, N,3-триметилазетидин-3-амин гидрохлорид (12,43 мг, 0,082 ммоль) и DIPEA (0,048 мл, 0,275 ммоль) растворяли в DMF (1,50 мл), затем добавляли HATU (31,4 мг, 0,082 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа (ход реакции контролировали по ЖХМС). Для расщепления нежелательных побочных продуктов добавляли гидразин (5,18 мкл, 0,165 ммоль), затем раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут. После этого реакционную смесь концентрировали, и неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (градиент 5-60% ACN/вода, колонка C18) с получением соли TFA указанного в заголовке соединения (25 мг, выход 62%). (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{30}H_{37}N_7O_2$ 528,30, найденное 528,2.

Пример 4: (S)-(3-(диметиламино)-3-метилазетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-

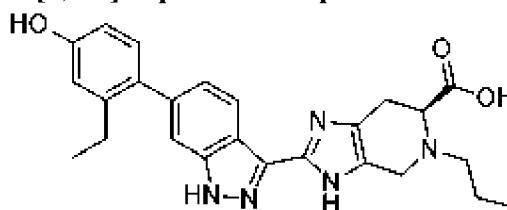
с]пиридин-6-ил) метанон



4

(S)-2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновую кислоту (40 мг, 0,090 ммоль) (I-19) N, N,3-триметилазетидин-3-амин гидрохлорид (20,29 мг, 0,135 ммоль) и DIPEA (0,047 мл, 0,269 ммоль) растворяли в DMF (1,50 мл), затем добавляли HATU (51,2 мг, 0,135 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов (ход реакции контролировали по ЖХМС). Для удаления нежелательных побочных продуктов добавляли гидразин (8,45 мкл, 0,269 ммоль), затем раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут. После этого реакционную смесь концентрировали, и неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (градиент 5-60% ACN/вода, колонка C18) с получением соли TFA указанного в заголовке соединения (26 мг, выход 38%). (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{31}H_{39}N_7O_2$ 542,32, найденное 542,2.

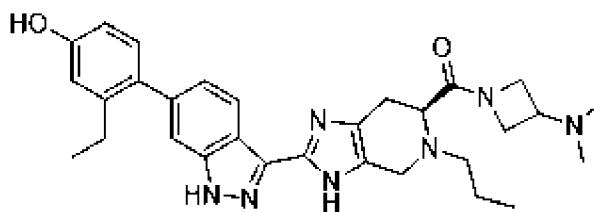
Получение 7: (S)-2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-пропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновая кислота (I-20)



I-20

(S)-2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновую кислоту, HCl (I-18) (0,160 г, 0,364 ммоль) и пропиональдегид (0,039 мл, 0,546 ммоль) растворяли в метаноле (3,0 мл), затем добавляли цианоборгидрид натрия (0,069 г, 1,091 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов (ход реакции контролировали по ЖХМС). Реакционную смесь концентрировали и неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой хроматографией (градиент 5-70% ACN/вода, колонка C18 50 г) с получением соли TFA указанного в заголовке соединения (78 мг, выход 38%). (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{25}H_{27}N_5O_3$ 446,21, найденное 446,3.

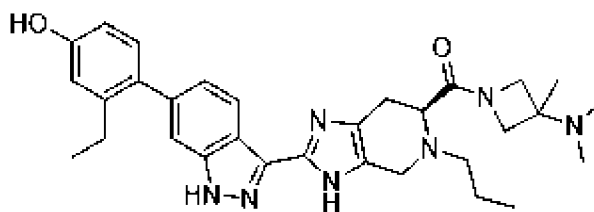
Пример 5: (S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-пропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-ил) метанон



5

(S)-2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-пропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновую кислоту, TFA (30 мг, 0,054 ммоль), (I-20) 3-(диметиламино)азетидина дигидрохлорид (13,92 мг, 0,080 ммоль) и DIPEA (0,047 мл, 0,268 ммоль) растворяли в DMF (1,50 мл), затем добавляли NATU (30,6 мг, 0,080 ммоль), и реакцию контролировали по ЖХМС. Для расщепления нежелательных побочных продуктов добавляли гидразин (5,05 мкл, 0,161 ммоль), затем раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут. После этого реакцию концентрировали, и неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (градиент 5-60% ACN/вода, колонка C18) с получением соли TFA указанного в заголовке соединения (26 мг, выход 63%). (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{30}H_{37}N_7O_2$ 528,30, найденное 528,2.

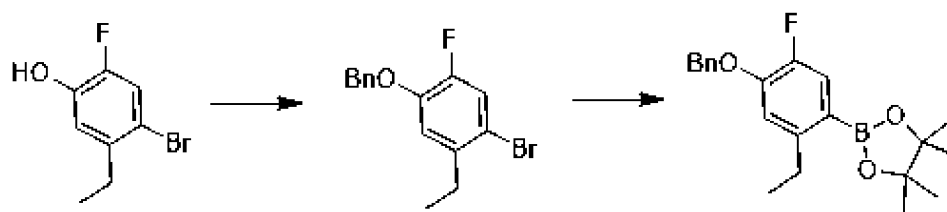
Пример 6: (S)-(3-(диметиламино)-3-метилазетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-пропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-ил) метанон



6

(S)-2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-пропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновую кислоту, TFA (30 мг, 0,054 ммоль), (I-20) N, N,3-триметилазетидин-3-амин гидрохлорид (12,12 мг, 0,080 ммоль) и DIPEA (0,047 мл, 0,268 ммоль) растворяли в DMF (1,50 мл), затем добавляли NATU (30,6 мг, 0,080 ммоль), и реакцию контролировали по ЖХМС. Для расщепления нежелательных побочных продуктов добавляли гидразин (5,05 мкл, 0,161 ммоль), затем раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут. После этого реакцию концентрировали, и неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (градиент 5-60% ACN/вода, колонка C18) с получением соли TFA указанного в заголовке соединения (18 мг, выход 44%). (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{31}H_{39}N_7O_2$ 542,32, найденное 542,2.

Получение 8: 2-(4-(Бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан



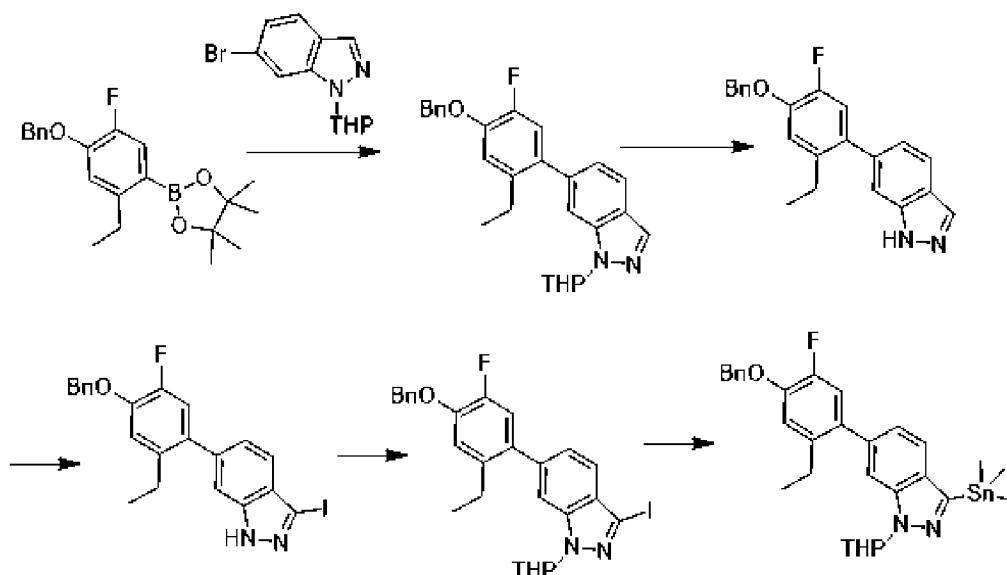
(а) 1-(Бензилокси)-4-бром-5-этил-2-фторбензол

К раствору 4-бром-5-этил-2-фторфенола (20 г, 910,32 ммоль) в ACN (250 мл) добавляли K_2CO_3 (31,55 г, 228,3 ммоль), и затем по каплям добавляли бензилбромид (13,10 мл, 109,58 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивали при 80°C в течение 2 часов. Водный слой экстрагировали EtOAc (три раза), объединяли и промывали рассолом. Органический слой сушили над Na_2SO_4 и упаривали при пониженном давлении с получением указанного в заголовке промежуточного соединения в виде бледно-желтой маслянистой жидкости (25 г, выход 89%). 1H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 7,48-7,30 (м, 5H), 7,27 (д, $J=10,5$ Гц, 1H), 6,87 (д, $J=8,7$ Гц, 1H), 5,12 (с, 2H), 2,66 (кв, $J=7,5$ Гц, 2H), 1,16 (т, $J=7,5$ Гц, 3H).

(б) 2-(4-(Бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан

К раствору продукта, полученного на предыдущей стадии (12,5 г, 40,45 ммоль), в диоксане (100 мл) добавляли бис(пинаколато)диборон (15,40 г, 60,67 ммоль) и KOAc (11,9 г, 121,35 ммоль). Реакционную смесь продували азотом в течение 15 минут с последующим добавлением комплекса [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладия (II) с дихлорметаном (1,65 г, 2,023 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивали и нагревали при 110°C в течение 3 часов, фильтровали через целит, и остаток промывали EtOAc. Фильтрат разбавляли избытком EtOAc (200 мл), и промывали водой (100 мл), затем рассолом (100 мл), сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме, получая сырой продукт, который очищали колоночной хроматографией на (100-200 мл) силикагеле элюируя смесью 3-5% EtOAc:гексан, с получением желаемого продукта в виде не совсем белого твердого вещества (9,50 г, выход 66%). 1H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 7,54-7,27 (м, 6H), 6,81 (д, $J=7,9$ Гц, 1H), 5,16 (с, 2H), 2,84 (кв, $J=7,5$ Гц, 2H), 1,32 (с, 12H), 1,14 (т, $J=7,5$ Гц, 3H).

Получение 9: 6-(4-(бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-1-(тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-3-(триметилстаннил)-1H-индазол



(а) 6-(4-(Бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-1-(тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)-1Н-индазол

К раствору 6-бром-1-(тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)-1Н-индазола (50 г, 178,57 ммоль) и 2-(4-(бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолана (76,3 г, 214,29 ммоль) в DMF:H₂O (480:120 мл) добавляли K₃PO₄ (94,64 г, 446,86 ммоль). Реакционную смесь дегазировали азотом в течение 15 минут, затем добавляли катализатор Pd(PPh₃)₂Cl₂ (6,26 г, 8,93 ммоль), и смесь снова дегазировали азотом в течение 5 минут, перемешивали и нагревали при 100-110°C в течение 5 часов. Реакционную смесь фильтровали через целит, и остаток промывали EtOAc. Фильтрат разбавляли EtOAc, промывали холодной водой и рассолом, сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме с получением сырого продукта, который очищали колоночной флэш-хроматографией с получением указанного в заголовке промежуточного продукта в виде белого твердого вещества (65 г, выход 86%). (m/z): [M+H]⁺ вычисленное для C₂₇H₂₇FN₂O₂ 431,21, найденное 431,46. ¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 8,06-7,98 (м, 2H), 7,70 (д, J=8,2 Гц, 1H), 7,51-7,32 (м, 5H), 7,08 (дд, J=809,6, 8,3 Гц, 1H), 7,03 (д, J=11,9 Гц, 1H), 6,95 (д, J=8,5 Гц, 1H), 5,76-5,64 (м, 1H), 5,20 (с, 2H), 4,04 (д, J=10,1 Гц, 1H), 3,72 (т, J=9,7 Гц, 1H), 2,52 (кв, J=7,5 Гц, 2H), 2,22-2,02 (м, 3H), 1,80-1,71 (м, 3H), 1,06 (т, J=7,5 Гц, 3H).

(b) 6-(4-(Бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-1Н-индазол

К раствору продукта, полученного на предыдущей стадии (65 г, 151,16 ммоль), в метаноле (700 мл) добавляли концентрированную HCl (120 мл), и полученный раствор нагревали при 60-65°C в течение 3 часов, охлаждали до комнатной температуры и концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в EtOAc и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃ и водой. Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке промежуточного продукта в виде белого твердого вещества (52 г, 99% (неочищенное)). ¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 8,13 (с, 1H), 7,77 (д, J=8,3 Гц, 1H), 7,59-7,30 (м, 6H), 7,10 (д, J=8,3 Гц, 1H), 7,01 (д, J=11,8 Гц, 1H), 6,96 (д, J=8,4 Гц, 1H), 5,21 (с, 2H), 2,53 (д, J=7,5 Гц, 2H), 1,05 (т, J=7,5 Гц, 3H).

(с) 6-(4-(Бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-3-иод-1H-индазол

К раствору 6-(4-(бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-1H-индазола (56 г, 161,18 ммоль) в DMF (400 мл) добавляли KOH (36,2 г, 647,39 ммоль), и смесь перемешивали 5 мин. Медленно добавляли раствор йода (82,2 г, 323,69 ммоль) в DMF (100 мл) при 0°C и перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут, разбавляли водой (3×150 мл) и экстрагировали EtOAc (3×200 мл). Органический слой промывали насыщенным водным раствором метабисульфита натрия (3×200 мл) и водой (400 мл), сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении с получением сырого продукта, который очищали флэш-хроматографией на колонке с получением указанного в заголовке промежуточного соединения в виде коричневатого полутвердого вещества (64 г, выход 84%). ¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 10,49 (с, 1H), 7,57-7,32 (м, 7H), 7,16 (д, J=8,3 Гц, 1H), 7,04-6,91 (м, 2H), 5,20 (с, 2H), 2,51 (кв, J=7,4 Гц, 2H), 1,04 (т, J=7,5 Гц, 3H).

(d) 6-(4-(Бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-3-иод-1-(тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-1H-индазол

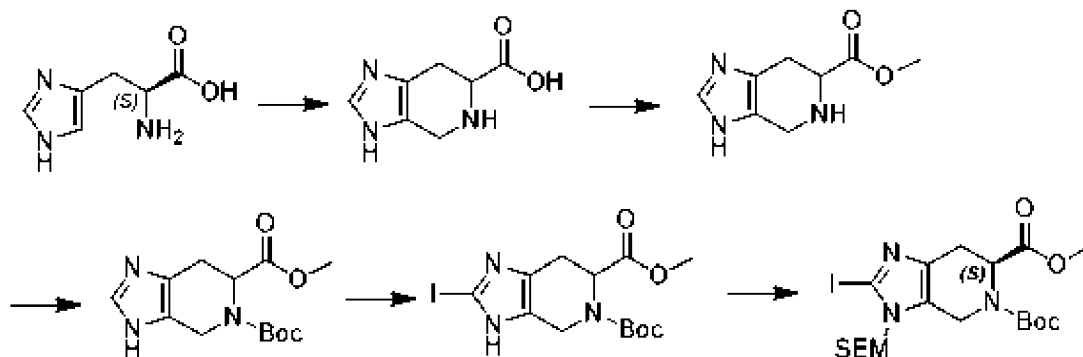
К охлажденному льдом раствору продукта, полученного на предыдущей стадии (60 г, 127,12 ммоль), в DCM (700 мл) добавляли п-толуолсульфоновую кислоту (4,84 г, 25,423 ммоль) и затем по каплям добавляли 3,4-дигидро-2H-пиран (17,43 мл, 190,68 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, разбавляли DCM и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃ и рассолом. Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении с получением сырого продукта, который очищали флэш-хроматографией (силикагель) с получением указанного в заголовке промежуточного вещества в виде грязно-белого твердого вещества (64 г, выход 91%). (m/z): [M+H]⁺ вычисленное для C₂₇H₂₆FIN₂O₂ 557,10, найденное 557,30. ¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 7,56-7,31 (м, 7H), 7,14 (д, J=8,3 Гц, 1H), 7,01 (д, J=11,8 Гц, 1H), 6,95 (д, J=8,5 Гц, 1H), 5,68 (д, J=9,3 Гц, 1H), 5,20 (с, 2H), 4,08-3,99 (м, 1H), 3,77-3,64 (м, 1H), 2,50 (кв, J=7,2 Гц, 2H), 2,23-1,97 (м, 3H), 1,81-1,68 (м, 3H), 1,06 (т, J=7,4 Гц, 3H).

(e) 6-(4-(бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-1-(тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-3-(триметилстаннил)-1H-индазол

К раствору 6-(4-(бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-3-иод-1-(тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-1H-индазола (20 г, 35,97 ммоль) в толуоле (150 мл) добавляли гексаметилдитин (9,2 мл, 43,17 ммоль). Реакционную смесь дегазировали азотом в течение 20 минут с последующим добавлением тетракиса (2,0 г, 1,80 ммоль) и затем перемешивали при 100°C в течение 2 часов, охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через целит, и остаток промывали EtOAc. Фильтрат концентрировали и очищали колоночной хроматографией (над нейтральным оксидом алюминия), элюируя смесью 2-5% EtOAc:гексан, с получением указанного в заголовке соединения (17,50 г, выход 82%). (m/z): [M+H]⁺ вычисленное для C₃₀H₃₅FN₂O₂Sn 595,17, 593,17, найденное 595,49, 593,55. ¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 7,68 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,57-7,29 (м, 6H), 7,13-7,00 (м, 2H), 6,96 (д, J=8,4 Гц, 1H), 5,81-5,68 (м, 1H), 5,21 (с, 2H), 4,13-4,00 (м, 1H), 3,81-3,66 (м,

1H), 2,54 (кв, J=7,3 Гц, 2H), 2,23-2,00 (м, 2H), 1,87-1,59 (м, 4H), 1,08 (т, J=7,5 Гц, 3H), 0,47 (с, 9H).

Получение 10: 5-(трет-бутил)-6-метил-(S)-2-иод-3-((2-триметилсилил)этокси)метил)-3,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилат



(a) (S)-4,5,6,7-Тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновая кислота

К перемешиваемой суспензии L-гистидина (50 г, 322,24 ммоль) в воде (420 мл) по каплям добавляли концентрированную HCl (29 мл) при 0°C, затем одной порцией добавляли формальдегид (55 мл, 676,72 ммоль) при 0°C. Полученную реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут и затем нагревали при 75°C в течение 6 часов и концентрировали. Полученный неочищенный продукт перемешивали в течение 2 ч с диэтиловым эфиром, фильтровали и промывали IPA:THF (100:300 мл) с получением HCl-соли указанного в заголовке промежуточного соединения в виде не совсем белого твердого вещества (75 г 99% выход (сырой)). (m/z): [M+H]⁺ вычисленное для C₇H₉N₃O₂ 168,07, найденное 168,17.

(b) Метил-(S)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоксилат

К перемешиваемому раствору продукта, полученного на предыдущей стадии (75,0 г, 312,5 ммоль), в метаноле (1500 мл) по каплям добавляли SOCl₂ (45,6 мл, 625 ммоль) при 0°C и перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов, затем нагревали до кипячения (70°C) в течение 1 ч. Растворитель удаляли дистилляцией, и сырой продукт растирали с метанолом и затем с диэтиловым эфиром с получением неочищенной соли HCl указанного в заголовке промежуточного соединения в виде не совсем белого твердого вещества (80 г, сырой). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 9,05 (с, 1H), 4,71 (дд, J=9,4, 5,2 Гц, 1H), 4,36 (д, J=15,5 Гц, 1H), 4,30 (д, J=15,6 Гц, 1H), 3,82 (с, 3H), 3,44-3,21 (м, 2H).

(c) 5-(трет-Бутил)-6-метил-(S)-3,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилат

К перемешиваемому раствору продукта, полученного на предыдущей стадии (80,0 г, 314,96 ммоль), в метаноле (1000 мл) добавляли DIPEA (282 мл, 1574 ммоль) и затем ди-трет-бутилдикарбонат (172 мл, 787,48 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов и затем добавляли жидкий NH₃ (150 мл, 25% в воде), и реакционную смесь снова перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре, метанол удаляли перегонкой, и остаток экстрагировали в DCM (3x200 мл).

Объединенные органические экстракты сушили над безводным Na_2SO_4 , концентрировали и очищали флэш-хроматографией (силикагель 100-200 меш), элюируя смесью 5% $\text{MeOH}:\text{DCM}$, с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (41 г, выход 46%). (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ вычисленное для $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$ 282,14, найденное 282,21. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 11,85 (с, 1H), 7,50 (с, 1H), 5,18 (дд, $J=49,3$, 5,1 Гц, 1H), 4,51 (т, $J=14,2$ Гц, 1H), 4,09 (дд, $J=43,9$, 16,1 Гц, 1H), 3,59 (с, 3H), 3,08 (д, $J=15,5$ Гц, 1H), 2,94 (д, $J=15,1$ Гц, 1H), 1,45 (с, 9H).

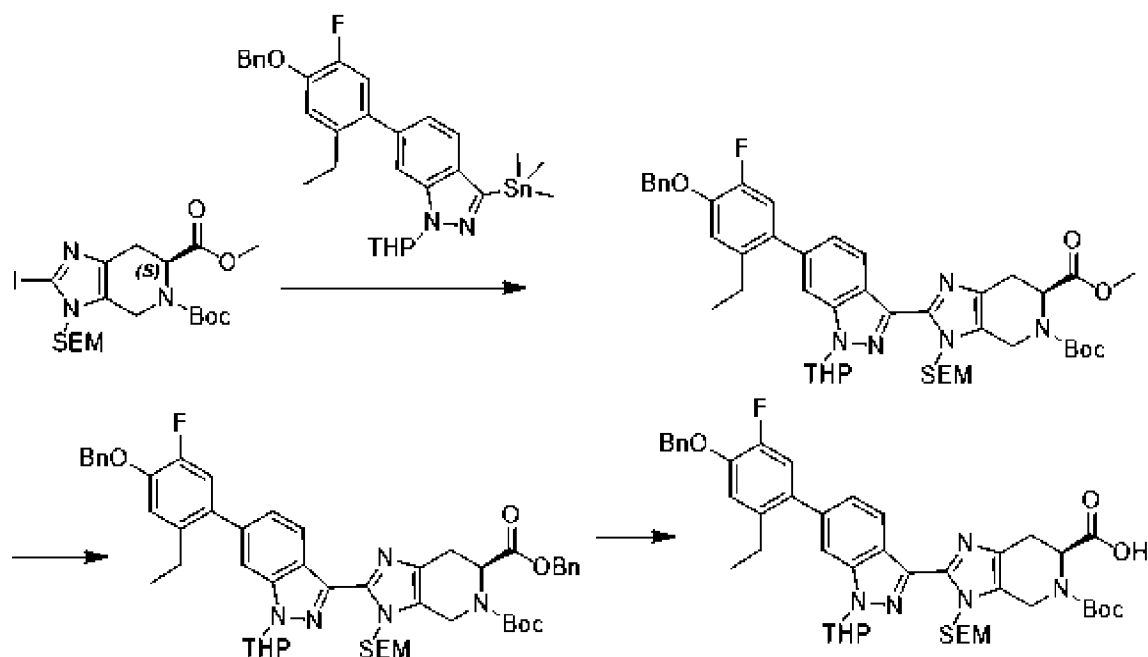
(d) 5-(трет-Бутил)-6-метил-(S)-2-йод-3,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилат

К раствору продукта, полученного на предыдущей стадии (41,0 г, 145,9 ммоль) в THF (500 мл), добавляли N-иодсукцинимид (66,0 г, 291,8 ммоль) при 0°C , и полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов, разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом. Органическую часть промывали 10% раствором тиосульфата натрия (3x200 мл). Объединенный органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением 60 г указанного в заголовке соединения (сырого), которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ вычисленное для $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{IN}_3\text{O}_4$ 408,03, найденное 408,31. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 12,48 (с, 1H), 5,34-4,97 (м, 1H), 4,67-4,35 (м, 1H), 4,12-3,95 (м, 1H), 3,60 (с, 3H), 3,14-2,82 (м, 2H), 1,44 (с, 9H).

(e) 5-(трет-Бутил)6-метил-(S)-2-йод-3-((2-триметилсилил)этокси)метил)-3,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилат

К перемешиваемому раствору 5-(трет-бутил)6-метил-(S)-2-йод-3,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилата (40 г, 0,098 моль) в DMF (150 мл) добавляли DIPEA (35,1 мл, 0,19 моль) при 0°C . Реакционную смесь перемешивали в течение 10 минут, затем по каплям добавляли 2-(триметилсилил)этоксиметилхлорид (19,1 мл, 0,10 моль) при 0°C . Полученную реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Через 4 ч добавляли охлажденную воду, и реакционную смесь экстрагировали EtOAc (2x200 мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, концентрировали и очищали колоночной флэш-хроматографией, элюируя смесью 20-35% EtOAc:гексан, с получением указанного в заголовке продукта в виде бледно-желтой вязкой жидкости (27 г). (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ вычисленное для $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{IN}_3\text{O}_5\text{Si}$ 538,12, найденное 538,42. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 5,33-5,04 (м, 3H), 4,79-4,56 (м, 1H), 4,54-4,14 (м, 1H), 3,60 (с, 3H), 3,47 (т, $J=7,8$ Гц, 2H), 3,31-3,16 (м, 1H), 2,97 (т, $J=18,9$ Гц, 1H), 1,44 (с, 9H), 0,92-0,74 (м, 2H), -0,03 (с, 9H).

Получение 11: (6S)-5-(трет-бутоксикарбонил)-2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1-(тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-1H-индазол-3-ил)-3-((2-(триметилсилил)этокси)метил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновая кислота



(a) 5-(трет-Бутил)6-метил-(6S)-2-(6-(4-(бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-1-(тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)-1Н-индазол-3-ил)-3-((2-(триметилсилил)этокси)метил)-3,4,6,7-тетрагидро-5Н-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилат

К перемешиваемому раствору 5-(трет-бутил)6-метил-(S)-2-йод-3-((2-триметилсилил)этокси)метил)-3,4,6,7-тетрагидро-5Н-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилата (17,0 г, 31,65 ммоль) в толуоле (500 мл) добавляли 6-(4-(бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-1-(тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)-3-(триметилстаннил)-1Н-индазол (20 г, 34,82 ммоль). Реакционную смесь продували аргоном в течение 15 минут, добавляли Pd (PPh₃)₄ (3,6 г, 3,16 ммоль) и иодид меди (1,20 г, 6,33 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при 120°C в течение 16 часов. Реакционную смесь фильтровали через целит, фильтрат концентрировали при пониженном давлении и очищали колоночной хроматографией на силикагеле (колонка Redisep 80 г, элюирование DCM в течение 10 минут, затем 15-20% EtOAc в гексане) с получением указанного в заголовке промежуточного соединения в виде желтого твердого вещества (15,10 г, выход 58%). (m/z): [M+H]⁺ вычисленное для C₄₆H₅₈FN₅O₇Si 840,41, найденное 840,54. ¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 8,43 (с, 1H), 7,54-7,33 (м, 6H), 7,20 (с, 1H), 7,05 (д, J=11,4 Гц, 1H), 6,95 (д, J=8,5 Гц, 1H), 6,09-5,69 (м, 3H), 5,59-5,36 (м, 1H), 5,20 (с, 2H), 4,97-4,80 (м, 1H), 4,12-3,90 (м, 1H), 3,68 (с, 3H), 3,57-3,47 (м, 2H), 3,40 (д, 1H), 3,21-3,05 (м, 1H), 2,74-2,34 (м, 4H), 2,25-2,07 (м, 2H), 1,94-1,65 (м, 4H), 1,54 (с, 9H), 1,12-0,99 (м, 3H), 0,91-0,75 (м, 2H), -0,12 (с, 9H).

(b) 6-Бензил-5-(трет-бутил)-(6S)-2-(6-(4-(бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-1-(тетрагидро-2Н-пиран-2-ил))-1Н-индазол-3-ил)-3-((2-(триметилсилил)этокси)метил)-3,4,6,7-тетрагидро-5Н-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилат

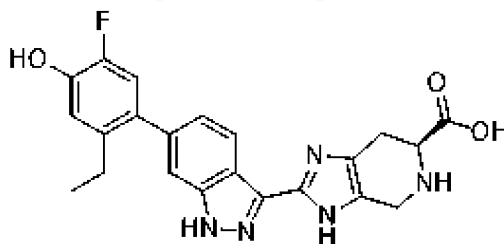
В круглодонную колбу добавляли продукт, полученный на предыдущей стадии (15,0 г, 17,85 ммоль), в толуоле (400 мл), бензиловом спирте (46,3 мл) и Ti(OEt)₄ (7,15 мл, 35,70 ммоль), и реакционную смесь энергично кипятили с обратным холодильником

(140°C) в течение 48 часов, разбавляли водой и экстрагировали DCM. Суспензию фильтровали, фильтрат сушили над Na_2SO_4 , концентрировали при пониженном давлении и очищали колоночной хроматографией на силикагеле (колонка Redisep 80 г, 0-5% EtOAc в гексане) в течение 20 минут для удаления избытка бензилового спирта, затем элюировали 10-15% EtOAc в гексане) с получением указанного в заголовке промежуточного соединения. ^1H ЯМР соответствует структуре. (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ вычисленное для $\text{C}_{52}\text{H}_{62}\text{FN}_5\text{O}_7\text{Si}$ 916,44, найденное 916,86.

(с) (6S)-5-(трет-бутоксикарбонил)-2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1-(тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)-1Н-индазол-3-ил)-3-((2-(триметилсилил)этокси)метил)-4,5,6,7-тетрагидро-3Н-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновая кислота

К перемешиваемому раствору продукта, полученного на предыдущей стадии (21,0 г, 22,92 ммоль), в 1:1 IPA:THF (400 мл)) добавляли $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (5,0 г). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч в баллоне с водородом, фильтровали через целит, концентрировали при пониженном давлении и очищали колоночной хроматографией на силикагеле (колонка Redisep 80 г, элюирование 25-40% EtOAc в гексане) с получением указанного в заголовке соединения (6,1 г, 8,29 ммоль) в виде не совсем белого твердого вещества). (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ вычисленное для $\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{FN}_5\text{O}_7\text{Si}$ 736,35, найденное 736,5. ^1H ЯМР соответствует структуре. (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ вычисленное для $\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{FN}_5\text{O}_7\text{Si}$ 736,35, найденное 736,5. ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12,94 (с, 1H), 9,86 (с, 1H), 8,34 (т, $J=7,6$ Гц, 1H), 7,66 (с, 1H), 7,20 (д, $J=8,7$ Гц, 1H), 7,03 (д, $J=11,8$ Гц, 1H), 6,93 (д, $J=9,1$ Гц, 1H), 6,11-5,77 (м, 3H), 5,33-5,06 (м, 1H), 4,87-4,56 (м, 1H), 4,52-4,14 (м, 1H), 3,97-3,69 (м, 2H), 3,53-3,40 (м, 2H), 3,23-3,11 (м, 1H), 3,11-2,93 (м, 1H), 2,47-2,44 (м, 2H), 2,13-1,96 (м, 2H), 1,68 (д, $J=70,9$ Гц, 4H), 1,48 (с, 9H), 1,02 (т, $J=7,5$ Гц, 3H) 0,86-0,68 (м, 2H), -0,17 (с, 9H).

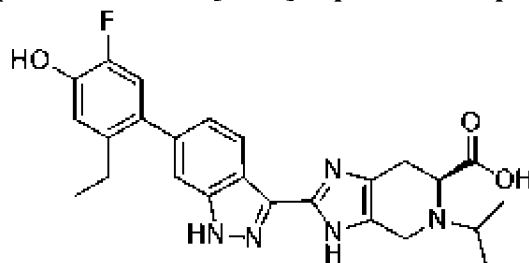
Получение 12: (S)-2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1Н-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3Н-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновая кислота



К перемешиваемому раствору (6S)-5-(трет-бутоксикарбонил)-2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1-(тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)-1Н-индазол-3-ил)-3-((2-(триметилсилил)этокси)метил)-4,5,6,7-тетрагидро-3Н-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновой кислоты (5,7 г, 7,75 ммоль) в смеси диоксан:вода 5:1 (60 мл) по каплям добавляли концентрированную HCl (20 мл) при 0°C. Реакционную смесь нагревали и перемешивали при 90°C в течение 16 ч и перегоняли под вакуумом с получением неочищенного остатка, который последовательно растирали с охлажденным диэтиловым эфиром и ацетонитрилом, получая HCl-соль указанного в заголовке соединения (3,6 г,

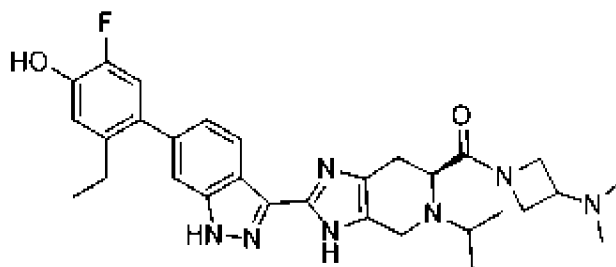
выход 95%) в виде светло-коричневого твердого вещества. (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{22}H_{20}FN_5O_3$ 422,16, найденное 422,24. 1H ЯМР (400 МГц, $D_2O/DMSO-d_6$) δ 8,22 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,49 (с, 1H), 7,19 (д, $J=8,1$ Гц, 1H), 6,99 (д, $J=11,9$ Гц, 1H), 6,91 (д, $J=9,0$ Гц, 1H), 4,56-4,51 (м, 1H), 4,36 (д, $J=15,5$ Гц, 1H), 4,30 (д, $J=15,5$ Гц, 1H), 3,35-3,25 (м, 1H), 3,15-3,05 (м, 1H), 2,4-2,55 (м, 2H), 0,97 (т, $J=7,5$ Гц, 3H).

Получение 13: (S)-2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновая кислота



К раствору (S)-2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновой кислоты, HCl (400 мг, 0,874 ммоль), ацетона (0,192 мл, 2,62 ммоль) и уксусной кислоты (0,150 мл, 2,62 ммоль) в DMF (7 мл) добавляли цианоборгидрид натрия (274 мг, 4,37 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Добавляли боргидрид натрия (33 мг, 0,874 ммоль), раствор концентрировали и очищали препаративной ВЭЖХ с получением соли TFA указанного в заголовке соединения (115 мг, выход 23%). (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{25}H_{26}FN_5O_3$ 464,20, найденное 464,5.

Пример 7: (S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-ил)метанон C-1

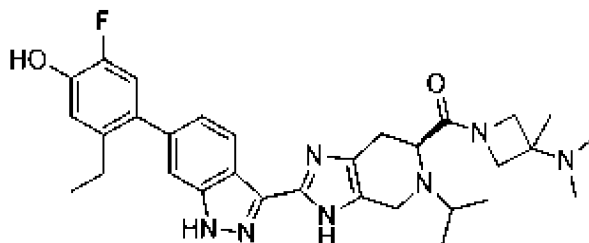


C-1

К раствору (S)-2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновой кислоты, TFA (179 мг, 0,310 ммоль), N, N-диметилазетидин-3-амин, 2 HCl (107 мг, 0,465 ммоль) и DIPEA (0,162 мл 0,930 ммоль) в DMF (4 мл), добавляли HATU (177 мг, 0,465 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Добавляли гидразин (5 экв.), реакционную смесь концентрировали и очищали препаративной ВЭЖХ с получением соли TFA указанного в заголовке соединения (63 мг, выход 26%). (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{30}H_{36}FN_7O_2$ 546,29, найденное 546,7. 1H ЯМР (400 МГц, $DMSO-d_6$) δ 9,90 (с, 1H), 8,29 (дд, 1H), 7,34 (с, 1H), 7,07 (д, 1H), 7,01 (д, 1H), 6,89 (д, 1H), 4,35-4,18

(m, 1H), 4,11-3,94 (m, 1H), 3,94-3,73 (m, 3H), 3,70-3,57 (m, 2H), 3,06-2,94 (m, 2H), 2,87-2,66 (m, 2H), 2,48-2,40 (m, 2H), 2,13-2,00 (m, 6H), 1,07 (t, 3H), 1,03-0,93 (m, 6H).

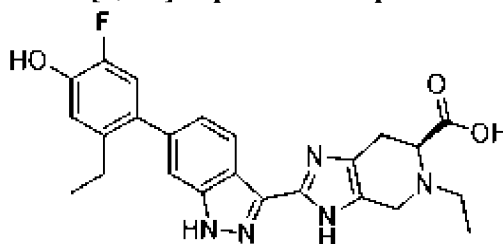
Пример 8: (S)-(3-(диметиламино)-3-метилазетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-ил)метанон



C-4

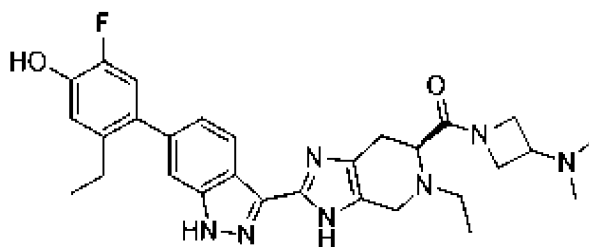
(S)-2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1Н-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3Н-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновую кислоту, TFA (30 мг, 0,052 ммоль), N, N,3-триметилазетидин-3-амин, 2HCl (29,2 мг, 0,156 ммоль) и DIPEA (0,045 мл, 0,260 ммоль) растворяли в DMF (1,0 мл), затем добавляли HATU (29,6 мг, 0,078 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 часов (ход реакции контролировали по ЖХМС). Для расщепления нежелательных побочных продуктов добавляли гидразин (4,90 мкл, 0,156 ммоль), затем раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут. После этого реакционную смесь концентрировали, и неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (градиент 2-70% ACN/вода, колонка C18) с получением соли TFA указанного в заголовке соединения (13 мг, выход 33%). (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{31}H_{38}FN_7O_2$ 560,31, найденное 560,2.

Получение 14: (S)-5-этил-2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновая кислота



(S)-2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1Н-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3Н-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновую кислоту, HCl (450 мг, 0,983 ммоль) и ацетальдегид (0,083 мл, 1,474 ммоль) растворяли в DMF (7 мл), затем добавляли цианоборгидрид натрия (247 мг, 3,93 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов (ход реакции контролировали по ЖХМС). Для гашения любого оставшегося ацетальдегида добавляли боргидрид натрия (112 мг, 2,95 ммоль), затем реакционную смесь концентрировали. После этого неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой хроматографией (градиент 5-65% ACN/вода, колонка 100 г C18aq) с получением соли TFA указанного в заголовке соединения (165 мг, выход 30%). (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{24}H_{24}FN_5O_3$ 450,19, найденное 450,2.

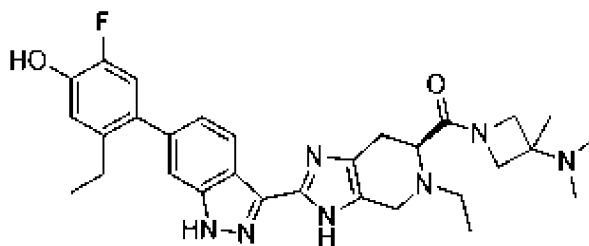
Пример 9: (S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(5-этил-2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-ил)метанон



C-2

(S)-5-этил-2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновую кислоту, TFA (30 мг, 0,053 ммоль) и HATU (30,4 мг, 0,080 ммоль) объединяли в DMF (1,0 мл). К раствору добавляли N, N-диметилазетидин-3-амин (16 мг, 0,160 ммоль) и DIPEA (0,037 мл, 0,213 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 часов (ход реакции контролировали по ЖХМС). Для расщепления нежелательных побочных продуктов добавляли гидразин (4,92 мкл, 0,160 ммоль), затем раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут. После этого реакционную смесь концентрировали и неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (градиент 10-70% ACN/вода, колонка Zorbax Bonus-RP) с получением соли TFA указанного в заголовке соединения (27 мг, выход 67%). (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{29}H_{34}FN_7O_2$ 532,28, найденное 532,2.

Пример 10: (S)-(3-(диметиламино)-3-метилазетидин-1-ил)(5-этил-2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-ил)метанон

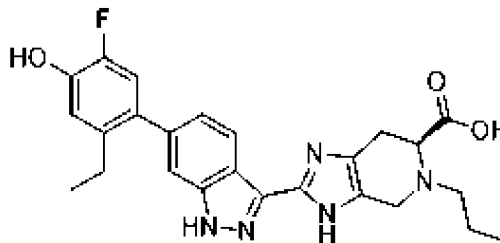


C-3

(S)-5-этил-2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновую кислоту, TFA (30 мг, 0,053 ммоль) и HATU (30,4 мг, 0,080 ммоль) объединяли в DMF (1,0 мл). К раствору добавляли N, N,3-триметилазетидин-3-амин (18 мг, 0,160 ммоль) и DIPEA (0,037 мл, 0,213 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 часов (ход реакции контролировали по ЖХМС). Для расщепления нежелательных побочных продуктов добавляли гидразин (4,92 мкл, 0,160 ммоль), затем раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут. После этого реакционную смесь концентрировали и неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (градиент 10-

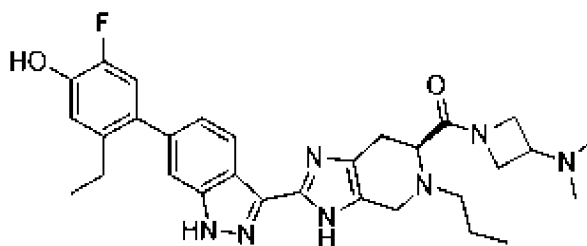
70% ACN/вода, колонка Zorbax Bonus-RP) с получением соли TFA указанного в заголовке соединения (28 мг, выход 68%). (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{30}H_{36}FN_7O_2$ 546,29, найденное 546,2.

Получение 15: (S)-2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-пропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновая кислота



(S)-2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновую кислоту, HCl (300 мг, 0,655 ммоль) и пропиональдегид (0,071 мл, 0,983 ммоль) растворяли в DMF (7 мл), затем добавляли цианоборгидрид натрия (124 мг, 1,966 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 72 часов (ход реакции контролировали по ЖХМС). Для гашения любого оставшегося альдегида добавляли боргидрид натрия (26 мг, 0,655 ммоль), затем реакционную смесь концентрировали. После этого неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (градиент 2-70% ACN/вода, колонка C18) с получением соли TFA указанного в заголовке соединения (117 мг, выход 31%). (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{25}H_{26}FN_5O_3$ 464,21, найденное 464,2.

Пример 11: (S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-пропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-ил)метанон

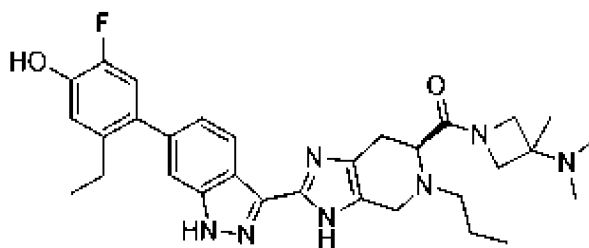


C-5

(S)-2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-пропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновую кислоту, TFA (33 мг, 0,057 ммоль), N, N-диметилазетидин-3-амин, 2HCl (29,7 мг, 0,171 ммоль) и DIPEA (0,060 мл, 0,343 ммоль) растворяли в DMF (2,0 мл), затем добавляли HATU (28,2 мг, 0,074 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов (ход реакции контролировали по ЖХМС). Для расщепления нежелательных побочных продуктов добавляли гидразин (8,97 мкл, 0,286 ммоль), затем раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут. После этого реакционную смесь концентрировали, и неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (градиент 2-70% ACN/вода, колонка C18) с получением соли TFA указанного в заголовке соединения

(27 мг, выход 61%). (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{30}H_{36}FN_7O_2$ 546,29, найденное 546,5.

Пример 12: (S)-(3-(диметиламино)-3-метилазетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-пропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-c]пиридин-6-ил)метанон



C-6

(S)-2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-пропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-c]пиридин-6-карбоновую кислоту, TFA (30 мг, 0,052 ммоль), N, N,3-триметилазетидин-3-амин, 2HCl (29,2 мг, 0,156 ммоль) и DIPEA (0,045 мл, 0,260 ммоль) растворяли в DMF (1,0 мл), затем добавляли HATU (29,6 мг, 0,078 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 часов (ход реакции контролировали по ЖХМС). Для расщепления нежелательных побочных продуктов добавляли гидразин (8,89 мкл, 0,260 ммоль), затем раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут. После этого реакционную смесь концентрировали, и неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (градиент 2-70% ACN/вода, колонка C18) с получением соли TFA указанного в заголовке соединения (15 мг, выход 37%). (m/z): $[M+H]^+$ вычисленное для $C_{31}H_{38}FN_7O_2$ 560,31, найденное 560,5.

Биологические анализы

Соединения по настоящему изобретению характеризовали с помощью одного или более из следующих биологических анализов.

Анализ 1: Биохимические анализы киназ JAK

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

Серийно разведенные соединения предварительно инкубировали с каждым из четырех ферментов JAK и субстратом в белых 384-луночных микропланшетах (Corning) при температуре окружающей среды в течение 1 часа. Затем добавляли АТФ для инициации киназных реакций общим объемом 10 мкл с 1% DMSO. Конечные концентрации фермента для JAK1, 2, 3 и Tyk2 составляли 4,2 нМ, 0,1 нМ, 1 нМ и 0,25 нМ соответственно; соответствующие используемые концентрации K_m АТФ составляли 25 мкМ, 3 мкМ, 1,6 мкМ и 10 мкМ; в то время как концентрация субстрата составляла 200 нМ во всех четырех анализах. Киназные реакции осуществляли в течение 1 часа при температуре окружающей среды до добавления 10 мкл препарата EDTA (конечная концентрация 10 mM) и Tb-анти-pSTAT1 (pTyг701) антитела (Life Technologies, конечная

концентрация 2 нМ) в буфере для разведения TR-FRET (Life Technologies). Планшеты инкубировали при температуре окружающей среды в течение 1 часа перед считыванием на ридере EnVision (Perkin Elmer). Записывали сигналы коэффициента излучения (520 нм/495 нм), которые затем использовали для вычисления процента ингибирования с учетом контроля DMSO и фоновых контролей.

Для анализа зависимости реакции от дозы строили график зависимости процента ингибирования от концентраций соединения, и значения IC_{50} определяли путем подгонки 4-параметрической логистической модели с помощью программного обеспечения Prism (GraphPad Software). Результаты выражали в виде pIC_{50} (отрицательный логарифм IC_{50}) и преобразовывали в pKi (отрицательный логарифм константы диссоциации Ki) с помощью уравнения Ченга-Прусса.

Тестируемые соединения, имеющие более низкое значение Ki или более высокое значение pKi в четырех анализах JAK, показали более сильное ингибирование активности JAK.

Анализ 2: Ингибирование IL-2-стимулированного pSTAT5 в Т-клетках Tall-1

Эффективность тестируемых соединений в отношении ингибирования фосфорилирования STAT5, стимулированного интерлейкином-2 (IL-2), измеряли в линии Т-клеток человека Tall-1 (DSMZ) с помощью набора AlphaLisa. Поскольку IL-2 передает сигнал через JAK1/3, этот анализ обеспечивает измерение клеточной активности JAK1/3.

Фосфорилированный STAT5 измеряли с помощью набора AlphaLISA SureFire Ultra pSTAT5 (Tyr694/699) (PerkinElmer).

Человеческие Т-клетки из линии клеток Tall-1 культивировали в увлажненном инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ в RPMI (Life Technologies) с добавлением 15% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (FBS, Life Technologies), 2 мМ глутамакса (Life Technologies), 25 мМ HEPES (Life Technologies) и 1X Пен-Стрепа (Pen/Strep) (Life Technologies). Соединения серийно разбавляли в DMSO и с помощью акустической системы дозировали в пустые лунки. Добавляли среду для анализа (DMEM без фенолового красного (Life Technologies) с добавлением 10% FBS (ATCC)) (4 мкл/лунка), и планшеты встряхивали при 900 об/мин в течение 10 минут. Клетки высевали в среду для анализа (4 мкл/лунку) из расчета 45000 клеток/лунку и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 1 часа с последующим добавлением IL-2 (R&D Systems; конечная концентрация 300 нг/мл) в предварительно нагретой среде для анализа (4 мкл) в течение 30 минут. После цитокиновой стимуляции клетки лизировали 6 мкл 3х буфера для лизиса AlphaLisa (PerkinElmer), содержащего 1х таблетки PhosStop и Complete (Roche). Лизат встряхивали при 900 об/мин в течение 10 минут при комнатной температуре (RT). Фосфорилированный STAT5 измеряли с помощью набора pSTAT5 AlphaLisa (PerkinElmer). Свежеприготовленную смесь акцепторных гранул вносили в лизат (5 мкл), облучая светом, проходящим через зеленый фильтр и обеспечивающим освещенность <100 люкс. Планшеты встряхивали при 900 об/мин в течение 2 минут, центрифугировали в течение короткого промежутка времени и инкубировали в течение 2 часов при

комнатной температуре в темноте. Дозировали донорные гранулы (5 мкл), облучая светом, проходящим через зеленый фильтр и обеспечивающим освещенность <100 люкс. Планшеты встряхивали при 900 об/мин в течение 2 минут, центрифугировали в течение короткого промежутка времени и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре в темноте. Люминесценцию измеряли при длине волны возбуждения 689 нм и длине волны эмиссии 570 нм с помощью планшетного ридера EnVision (PerkinElmer), облучая светом, проходящим через зеленый фильтр и обеспечивающим освещенность <100 люкс.

Для определения ингибирующей способности тестируемых соединений в ответ на IL-2 измеряли среднюю интенсивность излучения гранул, связанных с pSTAT5, в линии Т-клеток человека. Значения IC₅₀ определяли из анализа кривых зависимости ингибирования интенсивности сигнала от концентрации соединения. Данные выражали в виде значений pIC₅₀ (отрицательного десятичного логарифма IC₅₀) (среднее значение ± стандартное отклонение).

Результаты анализа in vitro

Таблица 1

Пример №	JAK1 pK_i	JAK2 pK_i	JAK3 pK_i	Tyk2 pK_i	Tall-1 pIC₅₀
1	10,2	10,5	10,2	9,1	8,6
C-1	10,4	10,8	10,1	9,5	8,8
2	10,3	10,7	10,3	9,2	8,7
C-2	10,2	10,9	9,5	9,4	8,7
3	10,4	10,6	10,2	9,1	8,6
C-3	10,3	10,9	9,7	9,4	8,7
4	10,0	10,8	9,9	9,1	8,7
C-4	10,1	10,9	9,5	9,4	8,6
5	10,5	10,6	10,3	9,0	8,7
C-5	10,1	10,8	10,0	9,4	8,7
6	10,3	10,5	9,8	9,0	8,6
C-6	10,3	10,7	10,0	9,3	8,6

Анализ 3: Мышиная модель IL-13-индуцированной индукции pSTAT6 в легочной ткани.

IL-13 является важным цитокином, лежащим в основе патофизиологии астмы (Kudlacz et al. Eur. J. Pharmacol, 2008, 582, 154-161). IL-13 связывается с рецепторами клеточной поверхности, активируя членов семейства Янус-киназ (JAK), которые затем фосфорилируют STAT6 и впоследствии активируют дальнейшие пути транскрипции. В описанной модели дозу IL-13 доставляли локально в легкие мышей, чтобы вызвать

фосфорилирование STAT6 (pSTAT6), которое затем измеряли в виде конечной точки.

В анализе использовали взрослых мышей Balb/c от Harlan. В день исследования животных слегка анестезировали изофлураном, и им вводили либо носитель, либо тестируемое соединение (1 мг/мл, общий объем 50 мкл за несколько вдохов) путем пероральной аспирации. После введения дозы животных оставляли в положении лежа на боку и наблюдали за их полным восстановлением после анестезии перед возвращением в домашнюю клетку. Через четыре часа животных снова анестезировали на короткое время и сенсibilizировали либо носителем, либо IL-13 (общая доставляемая доза 0,03 мкг, общий объем 50 мкл) путем пероральной аспирации, после чего наблюдали за их восстановлением после анестезии и возвращали в домашнюю клетку. Через час после введения носителя или IL-13 брали образцы цельной крови и легкие для детектирования pSTAT6 в гомогенатах легких, используя набор для анализа Perkin Elmer AlphaLISA® SureFire® Ultra™ HV p-STAT6 (Tyr641), и для анализа общей концентрации лекарственного средства в легких и плазме. Образцы крови центрифугировали (центрифуга Eppendorf, 5804R) в течение 4 минут при приблизительно 12000 об/мин при 4°C для сбора плазмы. Легкие промывали DPBS (забуференный фосфатом физиологический раствор Дульбекко), сушили, быстро замораживали, взвешивали и гомогенизировали при разведении 1:3 в 0,1% муравьиной кислоте в воде для ВЭЖХ. Уровни тестируемого соединения в плазме и легких определяли с помощью анализа ЖХ-МС относительно аналитических стандартов, на основании которых строили стандартную кривую в тестовой матрице. Отношение легких к плазме определяли как отношение концентрации в легких в нг/г к концентрации в плазме в нг/мл через 5 часов.

Активность модели подтверждали снижением уровня pSTAT6, присутствующего в легких обработанных животных через 5 часов, по сравнению с контрольными IL-13-сенсibilizированными животными, обработанными носителем. В каждом эксперименте разницу между IL-13-сенсibilizированными контрольными животными, обработанными носителем, и сенсibilizированными носителем контрольными животными, обработанными носителем, определяли равной 0% и 100% ингибирующего эффекта, соответственно. Соединения, протестированные в этом анализе, продемонстрировали ингибирование фосфорилирования STAT6 через 5 часов после сенсibilизации IL-13, как указано ниже.

Таблица 2: Наблюдаемое ингибирование pSTAT6 и концентрации в плазме/легких

Соединение	Концентрация в легких (нг/г) через 5 часов	Концентрация в плазме (нг/мл) через 5 часов	Отношение легкие/плазма через 5 часов	Ингибирование pSTAT6 через 5 часов
1	10155±1979	24,0±16,2	423	75
2	7750±1652	23±6	339	72
3	5130±2205	24±6	216	73
4	15000±3349	55±21	271	72

Соединение	Концентрация в легких (нг/г) через 5 часов	Концентрация в плазме (нг/мл) через 5 часов	Отношение легкие/плазма через 5 часов	Ингибирование pSTAT6 через 5 часов
5	6940±4248	25±9	281	55
6	7465±3084	23±2,5	330	66

Наблюдаемая высокая концентрация соединения в мышинных легких подтверждает, что наблюдаемое ингибирование IL-13-индуцированной индукции pSTAT6 является результатом активности тестируемого соединения. Отношение легких к плазме через 5 часов показало, что концентрация соединения 1 в легких значительно превышает его концентрацию в плазме мышей.

Анализ 4: Ингибирование TSLP-вызванного высвобождения TARC в мононуклеарных клетках периферической крови человека

Тимический стромальный лимфопоэтин (TSLP) и тимус и регулируемый активацией хемокин (TARC) сверхэкспрессируются в дыхательных путях при астме и коррелируют с тяжестью заболевания. В легких TSLP может высвобождаться эпителиальными клетками бронхов в ответ на аллергены и вирусные инфекции. Сигналы TSLP, поступающие через гетеродимер IL-7R α /TSLPR, обнаруживаются в широком диапазоне тканей и типов клеток, включая эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, нейтрофилы, макрофаги и тучные клетки. Связывание TSLP с рецептором вызывает конформационное изменение, которое активирует JAK1 и JAK2 на фосфорилирования различных факторов транскрипции, включая STAT3 и STAT5. В иммунных клетках это запускает каскад внутриклеточных событий, которые приводят к пролиферации клеток, антиапоптозу, миграции дендритных клеток и продукции цитокинов и хемокинов Th2. В мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) TSLP оказывает провоспалительное действие, активируя миелоидные дендритные клетки для привлечения и стимуляции Т-клеток, процесс, опосредованный хемоаттрактантом TARC.

В этом анализе было показано, что стимуляция TSLP индуцирует высвобождение TARC из PBMC и что этот ответ ослабляется дозозависимым образом при обработке соединением. Эффективность тестируемых соединений измеряли по ингибированию высвобождения TARC.

Аликвоты PBMC (ранее выделенные из цельной крови и замороженные в аликвотах при -80°C), полученные от 3 до 5 доноров, размораживали при 37°C и добавляли по каплям к 40 мл предварительно нагретой, стерильно фильтрованной, полной среды RPMI в 50 мл пробирках Falcon. Клетки осаждали и ресуспендировали в полной среде с плотностью $2,24 \times 10^6$ клеток/мл. Клетки высевали по 85 мкл (190000 клеток) на лунку в 96-луночный планшет с плоским дном, обработанным культурой ткани. Клетки оставляли на 1 час при 37°C и 5% CO₂.

Соединения получали в виде 10 мМ маточных растворов в DMSO. Выполняли 3,7-кратные серийные разведения для получения 9 концентраций тестируемого соединения в

DMSO при 300X конечной тестируемой концентрации для анализа. 150-кратные промежуточные разведения выполняли в полной среде с получением концентрации соединения, превышающей в 2X конечную тестируемую концентрацию с 0,2% DMSO. После 1-часового периода отдыха в каждую лунку с PBMC добавляли 95 мкл 2X соединения с диапазоном конечных аналитических концентраций от 33,33 мкМ до 0,95 мкМ. 95 мкл 0,2% DMSO в полной среде добавляли в необработанные контрольные лунки. Перед стимуляцией клетки предварительно обрабатывали соединением в течение 1 часа при 37°C и 5% CO₂.

Рекомбинантный белок TSLP человека восстанавливали в 10 мкг/мл в стерильном DPBS с 0,1% BSA и хранили в аликвотах при -20°C. Непосредственно перед использованием аликвоту размораживали и готовили с 20X конечной концентрацией для анализа в полной среде. 10 мкл 20X TSLP добавляли в каждую лунку с PBMC с получением конечной аналитической концентрации 10 нг/мл. В нестимулированные контрольные лунки добавляли 10 мкл полной среды. Клетки стимулировали в присутствии соединения в течение 48 часов при 37°C и 5% CO₂.

После стимуляции супернатанты клеточной культуры собирали, и определяли уровни TARC с помощью иммуноферментного анализа (ELISA), используя набор Human CCL17/TARC Quantikine ELISA (R&D Systems # DDN00) в соответствии с инструкциями производителя.

Для анализа реакции на дозу на график наносили логарифм [тестируемое соединение (M)] в зависимости от выраженного в процентах ответа у каждого донора, и значения IC₅₀ определяли методом нелинейного регрессионного анализа с помощью программного обеспечения GraphPad Prism, используя 4-параметрический сигмоидальный алгоритм реакции на дозу с переменным наклоном. Данные выражали в виде средних значений pIC₅₀ (отрицательный десятичный логарифм IC₅₀), вычисленных на основе значений pIC₅₀ отдельных доноров, и округляли до одного десятичного знака. Значения эффективности ингибирования для исходных соединений и их дезфтор-модифицированных аналогов приведены в Таблице 3.

Таблица 3: Значения эффективности (pIC₅₀) тестируемых соединений в отношении ингибирования TSLP-вызванного высвобождения TARC в мононуклеарных клетках периферической крови человека

Соединение	pIC ₅₀ ± стандартное отклонение
1	7,2 ± 0,1
C-1	7,0 ± 0,1

Анализ 5: метаболизм S9 в легких

Метаболическую стабильность соединений 1 и C-1 in vitro оценивали во фракции S9 легких человека (1 мкМ соединения; 1 мг/мл белка S9). Образцы, полученные через 0, 15, 30 и 60 минут, анализировали в отношении родительского соединения методом ЖХ-МС/МС высокого разрешения. Фракции S9 легких человека (партия 1410245) приобретали

у XenoTech LLC (Lenexa, KS). NADPH (Sigma Aldrich, N1630) и 3-фосфоаденозин-5-фосфосульфат (PAPS) (Sigma Aldrich, A1651) приобретали у Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Ацетонитрил и воду получали от VWR (Radnor, PA) с чистотой для ВЭЖХ или выше. Ралоксифен и муравьиную кислоту приобретали у Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Инкубацию S9 легких выполняли на водяной бане при 37°C в 96-луночном полипропиленовом планшете. Растворы S9 легких состояли из 100 мМ фосфата калия, забуференного до pH 7,4 (BD Biosciences, Woburn, MA), дополненным 1 мМ NADPH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 3 мМ хлорида магния (Sigma Aldrich, M1028), в присутствии 100 мкМ кофактора PAPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) с конечной концентрацией белка при инкубации 1 мг/мл. Маточные растворы ралоксифена в 10 мМ DMSO (n=1) и соединения (n=1) разводили в буфере и инкубировали с получением концентраций субстрата 1 мкМ (0,001% DMSO по объему). Инкубируемые объемы составляли 400 мкл, во временных точках 0, 15, 30 и 60 минут отбирали по 70 мкл аликвоты, которую разбавляли 140 мкл ацетонитрила (0% муравьиной кислоты). Все образцы центрифугировали при 2250 g в течение 10 минут при 5°C. Супернатант (50 мкл) получали из центрифугированных образцов и разбавляли 100 мкл воды для ВЭЖХ, содержащей внутренний стандарт. Образцы обрабатывали на пробоотборнике Dionex Ultimate 3000 Auto и анализировали с помощью масс-спектрометра высокого разрешения Thermo Q-Exactive (Thermo, Waltham, MA) в режиме полного сканирования в сочетании с колонкой Atlantis T3 3 мкМ - 2,1×50 мм (Waters Inc., 186003717). Подвижная фаза А состояла из воды+0,2% муравьиной кислоты, и подвижная фаза В состояла из ацетонитрила+0,2% муравьиной кислоты. Пиковую интеграцию получали, используя программное обеспечение Gubbs GMSU (Gubbs Inc., Alpharetta, GA). Для каждого образца рассчитывали отношения площадей пиков путем деления площади пика аналита на площадь пика внутреннего стандарта. Для каждой инкубации отношения площадей пиков аналитов в каждой точке t₀ устанавливали равными 100%, а отношения площадей пиков для 60-минутных образцов преобразовывали в проценты, оставшиеся относительно соответствующего t₀. Качественное определение образования сульфатного метаболита выполняли путем наблюдения пика раннего элюирования в канале родительского иона, который, на основании ранее полученных лабораторных данных, соответствовал метаболиту О-сульфата каждого родительского соединения. Результаты анализа приведены в таблице 4 (n=2 повтора).

Таблица 4: Метаболическая стабильность во фракции S9 легких человека

Соединение	Клиренс (мкл/мин/мг)	Соединение, оставшееся через 60 мин (%)	Наличие сульфата
1	3,5	81	Да
C-1	49,0	6	Да
2	0,6	98	Да
C-2	46,7	6	Да

3	0,8	97	Да
C-3	50,6	5	Да
4	0,0	100	Да
C-4	53,2	4	Да
5	1,6	96	Да
C-5	50,5	5	Да
6	1,8	90	Да
C-6	53,5	4	Да

Соединения 1-6, по сравнению с соответствующими им фторсодержащими аналогами (соединениями C-1 - C-6), вызывают значительно более низкий уровень сульфатирования в пути метаболизма.

BD Biosciences) используется для обнаружения фосфорилирования STAT3.

Анализ 6: Фармакокинетика в плазме и легких у мышей

Концентрации тестируемых соединений в плазме и легких и их соотношения определяли следующим образом. В анализе использовали мышей BALB/c из Charles River Laboratories. Отдельно готовили составы для каждого тестируемого соединения в концентрации 0,2 мг/мл в 20% пропиленгликоле в цитратном буфере, pH 4, и 50 мкл дозируемого раствора вводили в трахею мыши путем пероральной аспирации. В различные моменты времени (обычно через 0,167, 2, 6, 24 часа) после введения дозы у мышей брали образцы крови посредством сердечной пункции и иссекали интактные легкие. Образцы крови центрифугировали (центрифуга Eppendorf, 5804R) в течение 4 минут при приблизительно 12000 об/мин при 4°C для сбора плазмы. Легкие сушили, взвешивали и гомогенизировали при разведении 1:3 в стерильной воде. Концентрации тестируемого соединения в плазме и легких определяли с помощью анализа ЖХ-МС относительно аналитических стандартов, на основании которых строили стандартную кривую в тестовой матрице. Отношение легких к плазме определяли как отношение AUC легких в мкг ч/г к AUC плазмы в мкг ч/мл, где AUC обычно определяют как площадь под кривой зависимости концентрации тестируемого соединения от времени.

Таблица 5: Концентрация в плазме и ткани легких после однократного перорального введения тестовых соединений

Соединение	AUC ₍₀₋₂₄₎ в плазме (мкг ч/мл)	AUC ₍₀₋₂₄₎ в ткани легких (мкг ч/г)	Отношение AUC ткань легкого:плазма
1	0,943	54,5	57,8

Анализ 7: анализ IL-5-опосредованной выживаемости эозинофилов

Эффективность тестируемых соединений в отношении IL-5-опосредованной выживаемости эозинофилов может быть измерена в человеческих эозинофилах, выделенных из цельной крови человека (AllCells). Поскольку IL-5 передает сигнал через JAK, этот анализ позволяет измерить клеточную активность JAK.

Эозинофилы человека выделяют из свежей цельной крови человека (AllCells) здоровых доноров. Кровь смешивают с 4,5% декстраном (Sigma-Aldrich) в 0,9% растворе хлорида натрия (Sigma-Aldrich). Эритроциты оставляют на 35 минут для осаждения. Верхний слой, богатый лейкоцитами, удаляют, наносят на Ficoll-Paque (GE Healthcare) и центрифугируют при 600 g в течение 30 минут. Слои плазмы и мононуклеарных клеток удаляют перед лизированием слоя гранулоцитов водой для удаления любых загрязняющих эритроцитов. Эозинофилы дополнительно очищают с помощью набора для выделения эозинофилов человека (Miltenyi Biotec). Фракцию очищенных эозинофилов инкубируют с анти-CD16 FITC (Miltenyi Biotec) в течение 10 минут при 4°C в темноте. Чистоту проверяют с помощью проточного цитометра LSRII (BD Biosciences).

Клетки культивируют в увлажненном инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ в RPMI 1640 (Life Technologies) с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (FBS, Life Technologies), 2 mM глутамакса (Life Technologies), 25 mM HEPES (Life Technologies) и 1X Пен-Стрепа (Life Technologies). Клетки высевают из расчета 10000 клеток/лунку в среду (50 мкл). Планшет центрифугируют при 300 g в течение 5 минут, и удаляют супернатанты. Соединения подвергают серийному разведению в DMSO, и затем 500-кратному разведению до 2х конечной аналитической концентрации в среде. Тестируемые соединения (50 мкл/лунка) добавляют к клеткам и инкубируют при 37°C и 5% CO₂ в течение 1 часа с последующим добавлением IL-5 (R&D Systems; конечные концентрации 1 нг/мл и 10 пг/мл) в предварительно нагретой аналитической среде (50 мкл) в течение 72 часов.

После стимуляции цитокинами клетки центрифугируют при 300 g в течение 5 мин и дважды промывают холодным DPBS (Life Technologies). Для определения жизнеспособности и апоптоза клетки инкубируют с пропидий йодидом (Thermo Fisher Scientific) и APC Annexin V (BD Biosciences) и анализируют с помощью проточного цитометра LSRII (BD Biosciences). Значения IC₅₀ определяют из анализа кривых зависимости выраженной в процентах жизнеспособности клеток от концентрации соединения. Данные выражают в виде значений pIC₅₀ (отрицательного десятичного логарифма IC₅₀).

Анализ 8: Ингибирование хемокинов CXCL9 и CXCL10, индуцированных IFN γ и IL-27, в 3D культурах дыхательных путей человека

Культуры тканей EpiAirway получали от Mattek (AIR-100). Культуры получали от доноров-астматиков. Во вставке для клеточных культур выращивали человеческие эпителиальные клетки трахеи/бронхов и дифференцировали на пористой мембранной подложке, что позволило создать поверхность раздела воздух-жидкость с подогреваемой культуральной средой под клетками и газовой тестовой атмосферой над ними. Ткани культивировали в поддерживающей среде (Mattek, AIR-100-MM) в увлажненном инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Были протестированы четыре донора. В день 0 культуры тканей обрабатывали тестируемыми соединениями в концентрации 10 мкМ, 1 мкМ и/или 0,1 мкМ на границе раздела жидкости. Соединения разбавляли диметилсульфоксидом

(DMSO, Sigma) до конечной концентрации 0,1%. DMSO в концентрации 0,1% использовали в качестве контрольного носителя. Тестируемые соединения инкубировали с культурами в течение 1 часа при 37°C и 5% CO₂, после чего добавляли предварительно нагретую среду, содержащую IFN γ (R&D Systems) или IL-27 (R&D Systems) с конечной концентрацией 100 нг/мл. Культуры тканей поддерживали в течение 8 дней. Среду каждые 2 дня заменяли свежей средой, содержащей соединения и IFN γ или IL-27. В день 8 для анализа собирали культуры тканей и супернатанты. Образцы супернатанта анализировали на CXCL10 (IP-10) и CXCL9 (MIG) с помощью люминесцентного анализа (EMD Millipore). Данные выражали в % ингибирования $\pm$ стандартное отклонение ($\pm$ STDV). Процент ингибирования определяли по способности соединения ингибировать секрецию CXCL10 или CXCL9, индуцированную IFN γ или IL-27, по сравнению с клетками, обработанными носителем. Данные представляют собой средние значения от 4 доноров. Соединение 1 способно ингибировать IFN γ -индуцированную секрецию CXCL10 на 100% $\pm$ 1,0 (при 10 мкМ), 76% $\pm$ 13 (при 1 мкМ) и 18% $\pm$ 22 (при 0,1 мкМ) по сравнению с контрольным носителем. Соединение 1 способно ингибировать IFN γ -индуцированную секрецию CXCL9 на 100% $\pm$ 0,1 (при 10 мкМ), 93% $\pm$ 6,9 (при 1 мкМ) и 16% $\pm$ 41 (при 0,1 мкМ) по сравнению с носителем. Соединение 1 способно ингибировать IL-27-индуцированную секрецию CXCL10 на 100% $\pm$ 0,0 (при 10 мкМ), 98% $\pm$ 1,0 (при 1 мкМ) и 25% $\pm$ 26 (при 0,1 мкМ) по сравнению с контрольным носителем. Соединение 1 способно ингибировать IL-27-индуцированную секрецию CXCL9 на 100% $\pm$ 0,0 (при 10 мкМ), 97% $\pm$ 2,0 (при 1 мкМ) и 52% $\pm$ 18 (при 0,1 мкМ) по сравнению с контрольным носителем.

Анализ 9: Клеточный анализ активности JAK: ингибирование IL-2/анти-CD3-стимулированного IFN- γ в человеческих PBMC

Эффективность тестируемых соединений в отношении ингибирования гамма-интерферона (IFN γ), стимулированного интерлейкином-2 (IL-2)/анти-CD3, можно измерить в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC), выделенных из цельной крови человека (Stanford Blood Center). Поскольку IL-2 передает сигнал через JAK, этот анализ позволяет измерить клеточную активность JAK.

(1) Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяют из цельной крови здоровых доноров человека с помощью градиента фиколла. Клетки культивируют в увлажненном инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ в RPMI (Life Technologies) с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (FBS, Life Technologies), 2 мМ глутамакса (Life Technologies), 25 мМ HEPES (Life Technologies) и 1X Пен-Стрепа (Life Technologies). Клетки высевают из расчета 200000 клеток/лунку в среду (50 мкл) и культивируют в течение 1 часа. Соединения подвергают серийному разведению в DMSO, и затем 500-кратному разведению (до 2х конечной концентрации для анализа) в среде. Тестируемые соединения (100 мкл/лунка) добавляют к клеткам и инкубируют в течение 24 часов при 37°C и 5% CO₂ в течение 1 ч с последующим добавлением IL-2 (R&D Systems; конечная концентрация 100 нг/мл) и анти-CD3 (BD Biosciences; конечная концентрация 1 мкг/мл) в предварительно нагретой аналитической среде (50 мкл).

(2) После цитокиновой стимуляции клетки центрифугируют при 500 g в течение 5 минут, супернатанты удаляют и замораживают при -80°C . Для определения ингибирующей способности тестируемого соединения в ответ на IL-2/анти-CD3, с помощью ELISA (R&D Systems) измеряют концентрации IFN γ в супернатанте. Значения IC₅₀ определяют из анализа кривых зависимости ингибирования концентрации IFN γ от концентрации соединения. Данные выражают в виде значений pIC₅₀ (отрицательного десятичного логарифма IC₅₀).

Анализ 10: клеточный анализ активности JAK: ингибирование IL-2-стимулированного pSTAT5 в CD4+ Т-клетках

Эффективность тестируемых соединений в отношении ингибирования фосфорилирования STAT5, стимулированного интерлейкином-2 (IL-2)/анти-CD3, может быть измерена методом проточной цитометрии в CD4-позитивных (CD4+) Т-клетках в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC), выделенных из цельной крови человека (Stanford Blood Center). Поскольку IL-2 передает сигнал через JAK, этот анализ позволяет измерить клеточную активность JAK.

CD4+ Т-клетки идентифицируют, используя конъюгированное с фикоэритробилином (PE) анти-CD4 антитело (Clone RPA-T4, BD Biosciences), при этом конъюгированные с Alexa Fluor 647 анти-pSTAT5 антитела (pY694, Clone 47, BD Biosciences) используют для обнаружения фосфорилирования STAT5.

(1) Следуют протоколу анализа 9, параграф (1), за исключением того, что стимуляцию цитокинов анти-CD3 антителом выполняют в течение 30 минут вместо 24 часов.

(2) После стимуляции цитокинами клетки фиксируют предварительно нагретым фиксирующим раствором (200 мкл; BD Biosciences) в течение 10 минут при 37°C и 5% CO₂, дважды промывают буфером DPBS (1 мл, Life Technologies) и ресуспендируют в ледяном буфере Perm Buffer III (1000 мкл, BD Biosciences) в течение 30 мин при 4°C . Клетки дважды промывают 2% FBS в DPBS (буфер FACS), и затем ресуспендируют в буфере FACS (100 мкл), содержащем анти-CD4 PE (разведение 1:50) и анти-CD3 анти-CD3Alexa Fluor 647 (разведение 1:5) в течение 60 мин при комнатной температуре в темноте. После инкубации клетки дважды промывают буфером FACS перед анализом, выполняемом с помощью проточного цитометра LSRII (BD Biosciences). Для определения ингибирующей способности тестируемых соединений в ответ на IL-2/анти-CD3 измеряют среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) pSTAT5 в CD4+ Т-клетках. Значения IC₅₀ определяют из анализа кривых зависимости ингибирования MFI от концентрации соединения. Данные выражают в виде значений pIC₅₀ (отрицательного десятичного логарифма IC₅₀).

Анализ 11: Клеточный анализ активности JAK: ингибирование IL-4-стимулированного pSTAT6 в CD3+ Т-клетках

Эффективность тестируемых соединений для ингибирования фосфорилирования STAT6, стимулированного интерлейкином-4 (IL-4), может быть измерена методом

проточной цитометрии в CD3-позитивных (CD3⁺) Т-клетках в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC), выделенных из цельной крови человека (Stanford Blood Center). Поскольку IL-4 передает сигнал через JAK, этот анализ позволяет измерить клеточную активность JAK.

CD3⁺ Т-клетки идентифицируют с помощью конъюгированного с фикоэритробилином (PE) анти-CD3 антитела (Clone UCHT1, BD Biosciences), при этом конъюгированные с Alexa Fluor 647 анти-pSTAT6 антитела (pY641, Clone 18/P, BD Biosciences) используют для обнаружения фосфорилирования STAT6.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяют из цельной крови здоровых доноров, как в анализах 9 и 10. Клетки высевают из расчета 250000 клеток/лунку в среду (200 мкл), культивируют в течение 1 часа и затем ресуспендируют в среде для анализа (50 мкл) (RPMI с добавлением 0,1% бычьего сывороточного альбумина (Sigma), 2 mM глутамакса, 25 mM HEPES и 1X Пен-Стрепа), содержащей различные концентрации тестируемых соединений. Соединения подвергают серийному разведению в DMSO, и затем 500-кратному разведению (до 2х конечной концентрации для анализа) в среде для анализа. Тестируемые соединения (50 мкл) инкубируют с клетками при 37°C и 5% CO₂ в течение 1 ч с последующим добавлением IL-4 (50 мкл) (R&D Systems; конечная концентрация 20 нг/мл) в предварительно нагретой среде для анализа в течение 30 мин. После цитокиновой стимуляции клетки фиксируют предварительно нагретым фиксирующим раствором (100 мкл) (BD Biosciences) в течение 10 минут при 37°C и 5% CO₂, дважды промывают буфером FACS (1 мл) (2% FBS в DPBS) и ресуспендируют в ледяном буфере Perm Buffer III (1000 мкл) (BD Biosciences) в течение 30 минут при 4°C. Клетки дважды промывают буфером FACS, и затем ресуспендируют в буфере FACS (100 мкл), содержащем анти-CD3 PE (разведение 1:50) и анти-pSTAT6 Alexa Fluor 647 (разведение 1:5) в течение 60 мин при комнатной температуре в темноте. После инкубации клетки дважды промывали в буфере FACS перед анализом, выполняемом с помощью проточного цитометра LSRII (BD Biosciences).

Для определения ингибирующей способности тестируемого соединения в ответ на IL-4, измеряют среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) pSTAT6 в CD3⁺ Т-клетках. Значения IC₅₀ определяют из анализа кривых зависимости ингибирования MFI от концентрации соединения. Данные выражают в виде pIC₅₀ (отрицательного десятичного логарифма IC₅₀).

Анализ 12: Клеточный анализ активности JAK: ингибирование IL-6-стимулированного pSTAT3 в CD3⁺ Т-клетках

Для определения эффективности тестируемого соединения в отношении ингибирования фосфорилирования STAT3, стимулированного интерлейкемом-6 (IL-6), можно использовать протокол, аналогичный протоколу анализа 11. Для детектирования фосфорилирования STAT3 используют конъюгированные с Alexa Fluor 647 анти-pSTAT3 антитела (pY705, Clone 4/P, BD Biosciences).

Анализ 13: Мышиная модель эозинофильного воспаления легких,

индуцированного *Alternaria alternata*

Эозинофилия дыхательных путей является отличительным признаком астмы у человека. *Alternaria alternata* является грибковым аэроаллергеном, который может обострять астму у людей и вызывать эозинофильное воспаление в легких мышей (Havaux et al. Clin Exp Immunol. 2005 Feb; 139(2):179-88). На мышах было продемонстрировано, что альтерналириоз косвенно активирует резидентные лимфоидные клетки врожденного иммунитета 2-го типа в легких, которые отвечают (на, например, IL-2 и IL-7) и высвобождают JAK-зависимые цитокины (например, IL-5 и IL-13) и координируют эозинофильное воспаление (Bartemes et al. J Immunol. 2012 Feb 1; 188(3):1503-13).

В исследовании могут быть использованы самцы мышей C57 от Taconic в возрасте от семи до девяти недель. В день исследования животных слегка анестезируют изофлураном и вводят либо носитель, либо тестируемое соединение (0,03-1,0 мг/мл, общий объем 50 мкл за несколько вдохов) путем пероральной аспирации. После введения дозы животных оставляют лежать в горизонтальном положении и наблюдают за их полным восстановлением после анестезии перед возвращением в домашнюю клетку. Через час животных еще раз слегка анестезируют и сенсибилизируют либо носителем, либо экстрактом альтерналириоза (общее количество доставляемого экстракта 200 мкг, общий объем 50 мкл) путем пероральной аспирации, после чего наблюдают за их восстановлением после анестезии и возвращают в домашнюю клетку. Через 48 часов после введения альтерналириоза жидкость бронхоальвеолярного лаважа (BALF) собирают, и подсчитывают эозинофилы в BALF с помощью гематологической системы Advia 120 (Siemens). Активность модели подтверждают снижением уровня эозинофилов, присутствующих в BALF обработанных животных через 48 часов по сравнению с контрольными животными, обработанными носителем и сенсибилизированными альтерналириозом. Данные выражают в процентах ингибирования ответа эозинофилов в BALF животных, обработанных носителем и сенсибилизированных альтерналириозом. Для расчета процента ингибирования количество эозинофилов в BALF для каждого состояния преобразуют в процент от среднего количества эозинофилов в BALF животных, обработанных носителем и сенсибилизированных альтерналириозом, и вычитают из ста процентов.

Анализ 14: клеточный анализ активности JAK: ингибирование IFN γ -индуцированного pSTAT1

Эффективность тестируемых соединений в отношении ингибирования фосфорилирования STAT1, стимулированного интерфероном гамма (IFN γ), измеряли методом проточной цитометрии в CD14-позитивных (CD14+) моноцитах, полученных из цельной крови человека (Stanford Blood Center). Поскольку IFN γ передает сигнал через JAK, этот анализ позволяет измерять клеточную активность JAK.

Моноциты идентифицировали с помощью конъюгированного с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) анти-CD14 антитела (клон RM052, Beckman Coulter), при этом конъюгированное с Alexa Fluor 647 анти-pSTAT1 антитело (pY701, Clone 4a, BD

Biosciences) использовали для обнаружения фосфорилирования STAT1.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли из цельной крови здоровых доноров с помощью градиента фиколла. Клетки культивировали в увлажненном инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ в RPMI (Life Technologies) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Life Technologies), 2 mM глутамакса (Life Technologies), 25 mM HEPES (Life Technologies) и 1X Пен-Стрепа (Life Technologies). Клетки высевали из расчета 250000 клеток/лунку в среду (200 мкл), культивировали в течение 2 часов и ресуспендировали в аналитической среде (50 мкл) (RPMI с добавлением 0,1% бычьего сывороточного альбумина (Sigma), 2 mM глутамакса, 25 mM HEPES и 1X Пен-Стрепа), содержащей различные концентрации тестируемого соединения. Соединения подвергали серийному разведению в DMSO, и затем 1000-кратному разведению до получения конечной концентрации DMSO, равной 0,1%. Разведения тестируемого соединения инкубировали с клетками при 37°C и 5% CO₂ в течение 1 ч с последующим добавлением в среду (50 мкл) предварительно подогретого IFN γ (R&D Systems) до конечной концентрации 0,6 нг/мл в течение 30 мин. После цитокиновой стимуляции клетки фиксировали предварительно нагретым фиксирующим раствором (100 мкл) (BD Biosciences) в течение 10 минут при 37°C и 5% CO₂, дважды промывали буфером FACS (1 мл) (1% BSA в PBS), ресуспендировали в соотношении 1:10 в буфере анти-CD14 FITC:FACS (100 мкл) и инкубировали при 4°C в течение 15 мин. Клетки промывали один раз, и затем ресуспендировали в охлажденном льдом буфере Perm Buffer III (BD Biosciences) (100 мкл) в течение 30 минут при 4°C. Клетки дважды промывали буфером FACS, и затем ресуспендировали в соотношении 1:10 в буфере анти-pSTAT1 Alexa Fluor 647:FACS (100 мкл) в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте, дважды промывали в буфере FACS и анализировали с помощью проточного цитометра MACSQuant (Miltenyi).

Для определения ингибирующей способности тестируемого соединения измеряли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) pSTAT1 в CD14+ моноцитах. Значения IC₅₀ определяли из анализа кривых зависимости ингибирования MFI от концентрации соединения. Данные выражали в виде значений pIC₅₀ (отрицательного десятичного логарифма IC₅₀). В этом анализе соединение 1 имело значение pIC₅₀, равное 7,5.

Анализ 15: Анализ активности клеток JAK: ингибирование GM-CSF-индуцированного pSTAT5

Эффективность тестируемых соединений в отношении ингибирования фосфорилирования STAT5, стимулированного колониестимулирующим фактором гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF), измеряли методом проточной цитометрии в CD14-позитивных (CD14+) моноцитах, полученных из цельной крови человека (Stanford Blood Center). Поскольку GM-CSF передает сигнал через JAK, этот анализ позволяет измерять клеточную активность JAK.

Моноциты идентифицировали с помощью конъюгированного с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) анти-CD14 антитела (клон RM052, Beckman Coulter),

при этом конъюгированное с Alexa Fluor 647 анти-pSTAT5 антитело (pY694, BD Biosciences) использовали для обнаружения фосфорилирования STAT5.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли из цельной крови здоровых доноров с помощью градиента фиколла. Клетки культивировали в увлажненном инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ и в RPMI (Life Technologies) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Life Technologies), 2 mM глутамакса (Life Technologies), 25 mM HEPES (Life Technologies) и 1X Пен-Стрепа (Life Technologies). Клетки высевали из расчета 250000 клеток на лунку в среду (200 мкл), культивировали в течение 2 часов и ресуспендировали в среде для анализа (50 мкл) (RPMI с добавлением 0,1% бычьего сывороточного альбумина (Sigma), 2 mM глутамакса, 25 mM HEPES и 1X Пен-Стрепа), содержащей различные концентрации тестируемых соединений. Соединения подвергали серийному разведению в DMSO, и затем 1000-кратному разведению в среде до получения конечной концентрации DMSO, равной 0,1%. Разведения тестируемого соединения инкубировали с клетками при 37°C и 5% CO₂ в течение 1 ч с последующим добавлением в среду (50 мкл) предварительно нагретого GM-CSF (R&D Systems) до конечной концентрации 0,3 нг/мл в течение 15 мин. После цитокиновой стимуляции клетки фиксировали предварительно нагретым фиксирующим раствором (100 мкл) (BD Biosciences) в течение 10 минут при 37°C и 5% CO₂, дважды промывали буфером FACS (1 мл) (1% BSA в PBS), ресуспендировали в соотношении 1:10 в буфере анти-CD14 FITC:FACS (100 мкл) и инкубировали при 4°C в течение 15 мин. Клетки промывали один раз, и затем ресуспендировали в охлажденном льдом буфере Perm Buffer III (BD Biosciences) (100 мкл) в течение 30 минут при 4°C. Клетки дважды промывали буфером FACS, и затем ресуспендировали в соотношении 1:10 в буфере анти-pSTAT1 Alexa Fluor 647:FACS (100 мкл) в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте, дважды промывали в буфере FACS и анализировали с помощью проточного цитометра MACSQuant (Miltenyi).

Для определения ингибирующей способности тестируемого соединения измеряли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) pSTAT5 в CD14+ моноцитах. Значения IC₅₀ определяли из анализа кривых зависимости ингибирования MFI от концентрации соединения. Данные выражали в виде значений pIC₅₀ (отрицательного десятичного логарифма IC₅₀). В этом анализе соединение 1 имело значение pIC₅₀, равное 6,9.

Анализ 16: Анализ активности клеток JAK: ингибирование IL-12-индуцированного pSTAT4

Эффективность тестируемых соединений в отношении ингибирования фосфорилирования STAT4, стимулированного интерлейкином-12 (IL-12), измеряли методом проточной цитометрии в CD3-позитивных (CD3+) Т-клетках, полученных из цельной крови человека (Stanford Blood Center). Поскольку IL-12 передает сигнал через JAK, этот анализ позволяет измерять клеточную активность JAK.

CD3+ Т-клетки идентифицировали с помощью конъюгированного с фикоэритрином (PE) анти-CD3 антитела (клон UCHT1, BD Biosciences), при этом

конъюгированное с Alexa Fluor 647 анти-pSTAT4 антитело (клон 38/p-Stat4, BD Biosciences) использовали для обнаружения фосфорилирования STAT4.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли из цельной крови здоровых доноров с помощью градиента фиколла. Клетки культивировали в RPMI (Life Technologies) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Life Technologies), 2 mM глутамакса (Life Technologies), 25 mM HEPES (Life Technologies), 1X Пен-Стрепа (Life Technologies), связанного с планшетом очищенного анти-CD3 антитела (5 мкг/мл, клон UCHT1, BD Biosciences) и растворенного анти-CD28 антитела (1 мкг/мл, клон CD28.2, BD Biosciences) в течение 3 дней в увлажненном инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Клетки собирали, промывали средой, и затем ресуспендировали в среде, содержащей интерлейкин-2 (IL-2, 10 нг/мл, R&D Systems). Клетки культивировали в течение 3 дней в увлажненном инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Клетки собирали, промывали RPMI и высевали по 250000 клеток/лунку в среде (200 мкл), культивировали в течение 2 часов и ресуспендировали в среде для анализа (50 мкл) (RPMI с добавлением 0,1% бычьего сывороточного альбумина (Sigma), 2 mM Glutamax, 25 mM HEPES и 1X Пен-Стрепа), содержащей различные концентрации тестируемых соединений. Соединения подвергали серийному разведению в DMSO, и затем 1000-кратному разведению в среде до получения конечной концентрации DMSO, равной 0,1%. Разведения тестируемого соединения инкубировали с клетками при 37°C и 5% CO₂ в течение 1 ч с последующим добавлением в среду (50 мкл) предварительно подогретого IL-12 (R&D Systems) до конечной концентрации 10 нг/мл в течение 30 минут. После цитокиновой стимуляции клетки фиксировали предварительно нагретым фиксирующим раствором (100 мкл) (BD Biosciences) в течение 10 минут при 37°C и 5% CO₂, дважды промывали буфером FACS (1 мл) (1% BSA в PBS) и ресуспендировали в охлажденном льдом буфере Perm Buffer III (1000 мкл) (BD Biosciences) в течение 30 минут при 4°C. Клетки дважды промывали буфером FACS, и затем ресуспендировали в буфере FACS (100 мкл), содержащем анти-CD3 PE (разведение 1:50) и анти-pSTAT4 Alexa Fluor 647 (разведение 1:10) в течение 45 минут при комнатной температуре в темноте. После инкубации клетки дважды промывали буфером FACS перед анализом с использованием проточного цитометра MACSQuant (Miltenyi). Для определения ингибирующей способности тестируемого соединения измеряли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) pSTAT4 в CD3+ Т-клетках. Значения IC₅₀ определяли из анализа кривых ингибирования MFI в зависимости от концентрации соединения. Данные выражены в виде значений pIC₅₀ (отрицательный десятичный логарифм IC₅₀). Соединение 1 показало значение pIC₅₀, равное 6,0.

Анализ 17: Ингибирование секреции IFN γ в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов

Анализ реакции смешанной культуры лимфоцитов является анализом *in vitro*, имитирующим отторжение трансплантата. Т-клетки от одного донора культивируют с аллогенными дендритными клетками от другого донора. Эта реакция вызывает клеточный иммунный ответ, такой как секреция IFN γ .

CD14⁺ моноциты выделяли из цельной крови (Stanford blood center) человека-донора А с помощью градиента фиколла и путем магнитного разделения (микрогранулы CD14, Miltenyi). Моноциты дифференцировали в дендритные клетки путем культивирования клеток в RPMI (Life Technologies) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Life Technologies), 2 мМ глутамакса (Life Technologies), 1X Пен-Стрепа (Life Technologies), интерлейкина-4 (IL-4, 50 нг/мл, R&D Systems) и колониестимулирующего фактора гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF, 50 нг/мл, R&D Systems) в течение 6 дней в увлажненном инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Дендритные клетки собирали, промывали средой и затем активировали путем культивирования клеток в средах, содержащих липополисахарид из *Escherichia coli* (LPS, 100 нг/мл, Sigma), в течение 24 часов в увлажненном инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Клетки собирали, промывали средой, ресуспендировали до 400000 клеток/мл в среде и высевали с плотностью 10000 клеток/лунку/25 мкл. Выделяли свежие CD4⁺ Т-клетки из цельной крови (Stanford blood center) человека-донора В с помощью градиента фиколла и путем магнитного разделения (набор для выделения CD4⁺ Т-клеток, Miltenyi). Т-клетки ресуспендировали до 4000000 клеток/мл в RPMI (Life Technologies) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Life Technologies), 2 мМ глутамакса (Life Technologies), 25 мМ HEPES (Life Technologies) и 1X Пен-Стрепа (Life Technologies). CD4⁺ Т-клетки смешивали с дендритными клетками в количестве 100000 клеток/лунку/25 мкл. Клетки обрабатывали тестируемыми соединениями (50 мкл при 20 мкМ, 2 мкМ и/или 0,2 мкМ) с конечной концентрацией 10 мкМ, 1 мкМ и/или 0,1 мкМ. Соединения разбавляли диметилсульфоксидом (DMSO, Sigma) до конечной концентрации 0,1%. DMSO в концентрации 0,1% использовали в качестве контрольного носителя. Клетки выдерживали в течение 5 дней в увлажненном инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. На 5 день супернатанты собирали и измеряли содержание интерферона гамма (IFN γ) с помощью иммуноферментного анализа (ELISA). Процент ингибирования определяли по ингибирующей способности соединения в отношении секреции IFN γ по сравнению с клетками, обработанными носителем. Данные являются средними значениями для 4 доноров. Соединение 1 способно ингибировать секрецию IFN γ на 99% $\pm$ 0,4 (при 10 мкМ), 76% $\pm$ 10 (при мкМ) и 43% $\pm$ 12 (при 0,1 мкМ) по сравнению с контрольным носителем.

Анализ 18: Ингибирование спонтанной секреции периостина и IL-6 в 3D-культурах клеток дыхательных путей человека, полученных от астматических доноров.

Культуры тканей EpiAirway получали от Mattek (AIR-100). Клетки получали от доноров-астматиков, которые спонтанно секретируют периостин, белок внеклеточного матрикса, связанный с Th2-опосредованной астмой (эозинофильной), и интерлейкин-6 (IL-6), воспалительный цитокин, который играет роль как при Th2, так и не-Th2-связанной астме. Во вставке для клеточных культур выращивали человеческие эпителиальные клетки трахеи/бронхов и дифференцировали на пористой мембранной подложке, что позволило создать поверхность раздела воздух-жидкость с подогреваемой культуральной

средой под клетками и газовой тестируемой атмосферой над ней. Ткани культивировали в поддерживающей среде (Mattek, AIR-100-MM) в увлажненном инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Были протестированы четыре донора. В день 0 культуры тканей обрабатывали тестируемыми соединениями на границе раздела жидкости в концентрации 10 мкМ, 1 мкМ и/или 0,1 мкМ. Соединения разбавляли диметилсульфоксидом (DMSO, Sigma) до конечной концентрации 0,1%. DMSO в концентрации 0,1% использовали в качестве контрольного носителя. Культуры тканей поддерживали в течение 8 дней. Среду заменяли каждые 2 дня свежей средой, содержащей соединения. На 8-й день супернатанты собирали для анализа. Образцы супернатанта анализировали на периостин и интерлейкин-6 (IL-6) с помощью анализа на платформе Luminex (EMD Millipore). Данные выражали в % ингибирования $\pm$ стандартное отклонение ($\pm$ STDV). Процент ингибирования определяли по ингибирующей способности соединения в отношении спонтанной секреции периостина и IL-6 по сравнению с клетками, обработанными носителем. Данные представляли в виде среднего значения для 3 или 4 доноров. Соединение 1 было способно ингибировать спонтанную секрецию периостина на $62\% \pm 25$ (при 10 мкМ) и $40\% \pm 28$ (при 1 мкМ) по сравнению с контрольным носителем. Соединение 1 было способно ингибировать спонтанную секрецию IL-6 на $91\% \pm 9,0$ (при 10 мкМ), $70\% \pm 33$ (при 1 мкМ) и $10\% \pm 40$ (при 0,1 мкМ) по сравнению с носителем.

Структура кристаллов

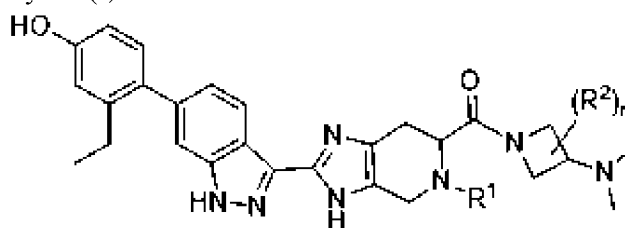
Получали сокристаллическую структуру соединения С-1, связанного с человеческим JAK1, с разрешением 2,28 Å. Было обнаружено, что лиганд связывается в участке связывания АТФ. Было идентифицировано семь специфических взаимодействий на основе водородных связей по расстоянию 3,5 Å или менее между донорными и акцепторными атомами. Особо следует отметить, что взаимодействие на основе водородных связей было идентифицировано между карбонилom экзоциклической амидной группы соединения С-1 и боковой цепью Arg879 JAK1. Подобное взаимодействие можно ожидать и для соединений по изобретению. В более ранних исследованиях по моделированию это взаимодействие было предложено как способ обеспечения селективности для JAK1 по сравнению с другими тирозинкиназами, поскольку при прочих равных условиях близкородственные киназы (например, TRKA, VEGFR, ABL1) не имели остатка аргинина в эквивалентном месте. Наблюдаемые результаты взаимодействия на основе водородных связей в кристаллической структуре и улучшенная селективность кинома по сравнению с видами, не содержащими экзоциклической амидной группы, подтверждают гипотезу о наличии этой структуры.

Хотя настоящее изобретение описано со ссылкой на конкретные аспекты или варианты его осуществления, специалисты в данной области техники поймут, что могут быть внесены различные изменения или эквивалентные замены без отклонения от сущности и объема изобретения. Кроме того, в той степени, в которой это разрешено применимым патентным законодательством и нормативными актами, все публикации, патенты и заявки на патенты, цитируемые в настоящем описании, включены в настоящее

описание посредством ссылки во всей их полноте в той же степени, как если бы каждый документ был включен в настоящее описание отдельно посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I):



(I)

где:

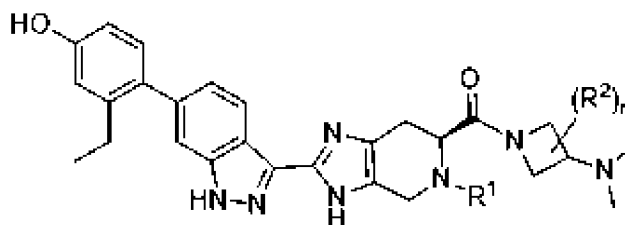
n равен 0, 1 или 2;

R¹ представляет собой C₁₋₃ алкил; и

каждый R² независимо представляет собой C₁₋₃ алкил;

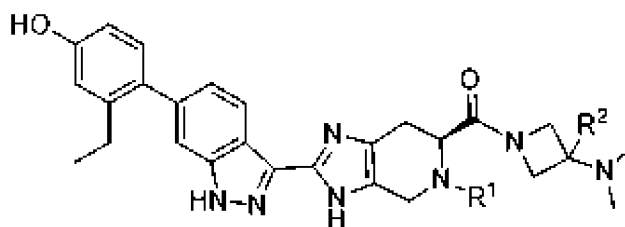
или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее формулу (II):



(II)

3. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее формулу (III):



(III)

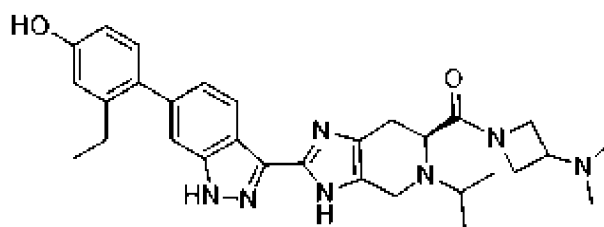
4. Соединение по любому из пп.1-3 или его фармацевтически приемлемая соль, в котором R¹ выбирают из группы, состоящей из этила, пропила и изопропила.

5. Соединение по любому из пп.1-4 или его фармацевтически приемлемая соль, в котором n равен 0.

6. Соединение по любому из пп.1-4 или его фармацевтически приемлемая соль, в котором n равен 1.

7. Соединение по любому из пп.1-4 или его фармацевтически приемлемая соль, в котором n равен 1, и R² представляет собой метил.

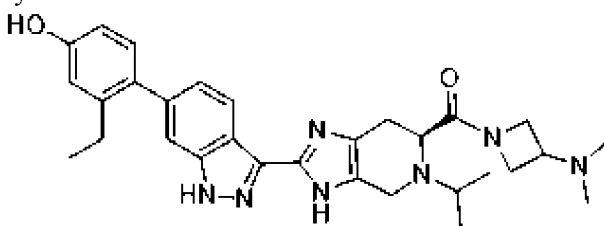
8. Соединение формулы **1**:



1

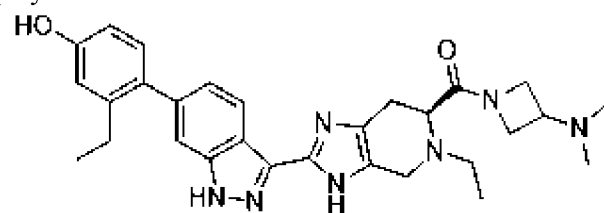
или его фармацевтически приемлемая соль.

9. Соединение формулы 1:



1

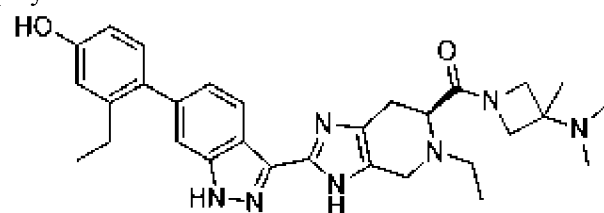
10. Соединение формулы 2:



2

или его фармацевтически приемлемая соль.

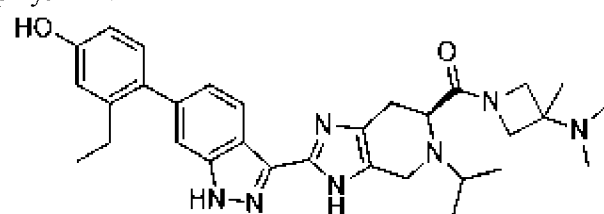
11. Соединение формулы 3:



3

или его фармацевтически приемлемая соль.

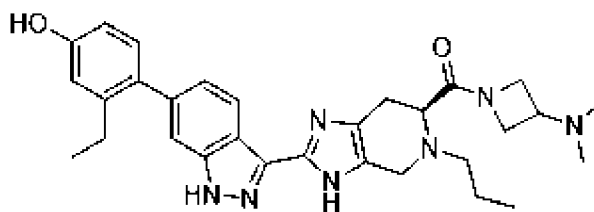
12. Соединение формулы 4:



4

или его фармацевтически приемлемая соль.

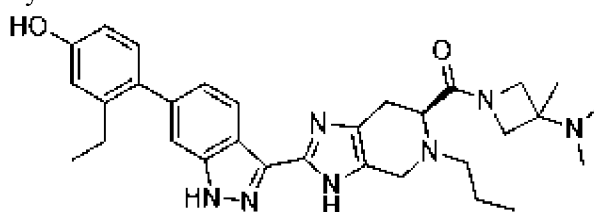
13. Соединение формулы 5:



5

или его фармацевтически приемлемая соль.

14. Соединение формулы 6:



6

или его фармацевтически приемлемая соль.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

16. Соединение по любому из пп.1-14 для применения в лечении респираторного заболевания у млекопитающего.

17. Соединение по п.16, в котором респираторное заболевание выбирают из группы, состоящей из астмы, хронической обструктивной болезни легких, муковисцидоза, пневмонита, идиопатического легочного фиброза, острого повреждения легких, острого респираторного дистресс-синдрома, бронхита, эмфиземы, облитерирующего бронхиолита, саркоидоза, эозинофильного заболевания, глистной инфекции, легочной артериальной гипертензии, лимфангиолейомиоматоза, бронхоэктазии, инфильтративного заболевания легких, лекарственного пневмонита, грибкового пневмонита, аллергического бронхолегочного аспергиллеза, гиперчувствительного пневмонита, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом, идиопатической острой эозинофильной пневмонии, идиопатической хронической эозинофильной пневмонии, гиперэозинофильного синдрома, синдрома Леффлера, облитерирующего бронхиолита с организующейся пневмонией, болезни «легочный трансплантат против хозяина» и пневмонита, индуцированного ингибиторами иммунных контрольных точек.

18. Соединение по п.16, в котором респираторное заболевание представляет собой астму или хроническую обструктивную болезнь легких.

19. Соединение по любому из пп.1-14 для применения при лечении отторжения легочного трансплантата у млекопитающего.

20. Соединение по п.19, в котором отторжение легочного трансплантата выбирают из группы, состоящей из первичной дисфункции трансплантата, организующейся пневмонии, острого отторжения, лимфоцитарного бронхиолита и хронической дисфункции легочного аллотрансплантата.

21. Соединение по п.19, в котором отторжение легочного трансплантата представляет собой острое отторжение легочного трансплантата.

22. Соединение по п.19, в котором отторжение легочного трансплантата представляет собой хроническую дисфункцию легочного аллотрансплантата.

23. Соединение по п.19, в котором отторжение легочного трансплантата выбирают из группы, состоящей из облитерирующего бронхиолита, рестриктивной хронической дисфункции легочного аллотрансплантата и нейтрофильной дисфункции аллотрансплантата.

24. Применение соединения по любому из пп.1-14 для производства лекарственного средства для лечения респираторного заболевания у млекопитающего.

25. Применение по п.24, в котором респираторное заболевание выбирают из группы, состоящей из астмы, хронической обструктивной болезни легких, муковисцидоза, пневмонита, идиопатического легочного фиброза, острого повреждения легких, острого респираторного дистресс-синдрома, бронхита, эмфиземы, облитерирующего бронхиолита, саркоидоза, эозинофильного заболевания, глистной инфекции, легочной артериальной гипертензии, лимфангиолейомиоматоза, бронхоэктазии, инфильтративного заболевания легких, лекарственного пневмонита, грибкового пневмонита, аллергического бронхолегочного аспергиллеза, гиперчувствительного пневмонита, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом, идиопатической острой эозинофильной пневмонии, идиопатической хронической эозинофильной пневмонии, гиперэозинофильного синдрома, синдрома Леффлера, облитерирующего бронхиолита с организующейся пневмонией, болезни «легочный трансплантат против хозяина» и пневмонита, индуцированного ингибиторами иммунных контрольных точек.

26. Применение по п.24, в котором респираторное заболевание представляет собой астму или хроническую обструктивную болезнь легких.

27. Применение соединения по любому из пп.1-14 для производства лекарственного средства для лечения отторжения легочного трансплантата у млекопитающего.

28. Применение по п.27, в котором отторжение легочного трансплантата выбирают из группы, состоящей из первичной дисфункции трансплантата, организующейся пневмонии, острого отторжения, лимфоцитарного бронхиолита и хронической дисфункции легочного аллотрансплантата.

29. Применение по п.27, в котором отторжение легочного трансплантата представляет собой острое отторжение легочного трансплантата.

30. Применение по п.27, в котором отторжение легочного трансплантата представляет собой хроническую дисфункцию легочного аллотрансплантата.

31. Применение по п.27, в котором отторжение легочного трансплантата выбирают из группы, состоящей из облитерирующего бронхиолита, рестриктивной хронической дисфункции легочного аллотрансплантата и нейтрофильной дисфункции аллотрансплантата.

32. Способ лечения респираторного заболевания у млекопитающего, включающий введение млекопитающему фармацевтической композиции, содержащей соединение по любому из пп.1-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

33. Способ по п.32, в котором респираторное заболевание выбирают из группы, состоящей из астмы, хронической обструктивной болезни легких, муковисцидоза, пневмонита, идиопатического легочного фиброза, острого повреждения легких, острого респираторного дистресс-синдрома, бронхита, эмфиземы, облитерирующего бронхиолита, саркоидоза, эозинофильного заболевания, глистной инфекции, легочной артериальной гипертензии, лимфангиолейомиоматоза, бронхоэктазии, инфильтративного заболевания легких, лекарственного пневмонита, грибкового пневмонита, аллергического бронхолегочного аспергиллеза, гиперчувствительного пневмонита, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом, идиопатической острой эозинофильной пневмонии, идиопатической хронической эозинофильной пневмонии, гиперэозинофильного синдрома, синдрома Леффлера, облитерирующего бронхиолита с организующейся пневмонией, болезни «легочный трансплантат против хозяина» и пневмонита, индуцированного ингибиторами иммунных контрольных точек.

34. Способ по п.32, в котором респираторное заболевание представляет собой астму или хроническую обструктивную болезнь легких.

35. Способ лечения отторжения легочного трансплантата у млекопитающего, включающий введение млекопитающему фармацевтической композиции, содержащей соединение по любому из пп.1-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

36. Способ по п.35, в котором отторжение легочного трансплантата выбирают из группы, состоящей из первичной дисфункции трансплантата, организующейся пневмонии, острого отторжения, лимфоцитарного бронхиолита и хронической дисфункции легочного аллотрансплантата.

37. Способ по п.35, в котором отторжение легочного трансплантата представляет собой острое отторжение легочного трансплантата.

38. Способ по п.35, в котором отторжение легочного трансплантата представляет собой хроническую дисфункцию легочного аллотрансплантата.

39. Способ по п.35, в котором отторжение легочного трансплантата выбирают из группы, состоящей из облитерирующего бронхиолита, рестриктивной хронической дисфункции легочного аллотрансплантата и нейтрофильной дисфункции аллотрансплантата.