

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040544**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.21

(21) Номер заявки
201990686

(22) Дата подачи заявки
2016.05.26

(51) Int. Cl. **C07D 519/00** (2006.01)
A61K 31/439 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ, СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ

(31) 62/167,694; 62/312,273

(32) 2015.05.28; 2016.03.23

(33) US

(43) 2019.08.30

(62) 201792619; 2016.05.26

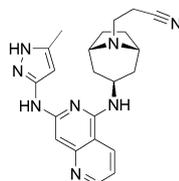
(56) WO-A1-2008119792
WO-A1-2007071348
WO-A2-2006067614

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ТЕРЕВАНС БАЙОФАРМА АР ЭНД
ДИ АЙПИ, ЭЛЭЛСИ (US)**

(72) Изобретатель:
**Хадсон Райан, Козак Дженнифер,
Фазери Пол Р., Подесто Данте Д.,
Брандт Гари И.Л., Флери Мелисса,
Босолей Анн-Мари, Хуан Сяоцзюнь,
Таллады Венкат Р. (US)**

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В., Кузнецова Т.В.,
Соколов Р.А. (RU)**

(57) Изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения желудочно-кишечного воспалительного заболевания, включающая соединение формулы



или его фармацевтически приемлемую соль; микрокристаллическую целлюлозу; лактозу; стеарат магния. Изобретение также раскрывает способ лечения желудочно-кишечного воспалительного заболевания у человека, включающий введение человеку упомянутой выше фармацевтической композиции.

B1

040544

040544

B1

Область, к которой относится изобретение

Изобретение направлено на фармацевтические композиции, включающие нафтиридиновые соединения, способы применения таких композиций для лечения воспалительных заболеваний.

Предшествующий уровень техники

Язвенный колит представляет собой хроническое воспалительное заболевание толстой кишки. Это заболевание характеризуется воспалением и изъязвлением слизистой оболочки прямой кишки и толстого кишечника. Общие симптомы включают диарею, кровянистый стул и абдоминальную боль. Клинический курс является интермиттирующим, характеризующимся чередующимися периодами обострения и ремиссии. Это заболевание, по всей видимости, встречается чаще в развитых странах, чем в развивающихся странах. По оценкам, 1,2 миллиона людей в основных индустриально развитых странах страдают язвенным колитом, и ожидают, что это число будет увеличиваться с ростом населения. Пациенты с язвенным колитом имеют повышенный риск развития колоректального рака (например, Danese et al. N. Engl. J. Med., 2011, 365, 1713-1725).

Хотя существует целый ряд терапевтических средств для промотирования и поддержания ремиссии язвенного колита (UC) у пациентов, ни одно из них не является идеальным. Лечение на основе сульфасалазина часто эффективно при легкой форме UC, но значительно менее эффективно при от среднетяжелой до тяжелой формах заболевания. Кортикостероиды часто применяют для обеспечения быстрой индукции ремиссии у пациентов со среднетяжелой до тяжелой формами UC. Однако длительное применение стероидов для поддержания ремиссии не поощряется, поскольку это связано с длительными побочными эффектами (например, остеопороз и переломы костей, инфекции, катаракты, медленное заживление ран и супрессия продукции гормонов надпочечников). Системные иммуносупрессанты, такие как азатиоприн, циклоспорин и метотрексат, обладают медленным началом действия и ограниченной эффективностью у пациентов со среднетяжелой до тяжелой формами UC, но длительное применение может быть проблематичным из-за таких последствий, как длительная системная иммуносупрессия (например, повышенный риск инфекций и лимфомы). Анти-TNF α антитела (например, инфликсимаб и адалимумаб), хотя и являются дорогими и требующими подкожного или внутривенного введения, эффективны у примерно 60-70% UC пациентов со среднетяжелой до тяжелой формами заболевания. Однако до одной трети пациентов не отвечают в достаточной степени на лечение, при том что у другой трети изначально отвечающих на лечение развивается резистентность в течение нескольких недель (Allez et al., J. Crohn's Cilitis, 2010, 4, 355-366; Rutgeerts et al., N. Engl. J. Med., 2005, 353, 2462-2476). Совсем недавно одобренная UC терапия, анти- $\alpha_4\beta_7$ интегринавое антитело ведолизумаб, является эффективной у пациентов со среднетяжелым до тяжелого UC, хотя парентеральный путь не является оптимальным, и последствия длительной иммуносупрессии через этот механизм еще нужно выяснить. Несмотря на существующие терапевтические средства, около 10-20% UC пациентов все еще нуждаются в колэктомии в течение 10 лет после постановки диагноза (Targownik et al., Am. J. Gastroenterol., 2012, 107, 1228-1235). Очевидно, что остается неудовлетворенная медицинская потребность в эффективной терапии для промотирования и поддержания ремиссии среднетяжелого до тяжелого UC без проблем безопасности, связанных с хронической системной иммуносупрессией.

Хотя механизм, лежащий в основе язвенного колита, не полностью выяснен, считается, что экологические факторы у генетически предрасположенных субъектов вызывают неадекватную (чрезмерную) реакцию иммунной системы на кишечную микробиоту, приводя к воспалению толстой кишки, повреждению ткани и связанным с этим симптомам, характерным для заболевания.

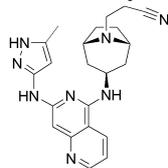
Хотя точный патогенез UC не установлен, очевидно, что провоспалительные цитокины играют ключевую роль в иммунологическом ответе (Strober et al., Gastroenterol., 2011, 140, 1756-1767). Многие из провоспалительных цитокинов, наиболее часто повышенных при UC (например, IL-4, IL-6, IL-13, IL-15, IL-23, IL-24, IFN γ и лептин), используют JAK семейство тирозинкиназ (т.е. JAK1, JAK2, JAK3 и Тук2) для передачи сигнала. Связывание лиганда с цитокиновым рецептором запускает автофосфорилирование ассоциированной с ним JAK, что, в свою очередь, приводит к фосфорилированию белка передатчика сигнала и активатора трансдукции (STAT). Различные STATs образуют гетеро- или гомодимеры и промотируют транскрипцию их целевых генов в клеточном ядре для регуляции функций, таких как клеточный рост, дифференциация и гибель (Clark et al., J. Med. Chem., 2014, 57, 5023-5038).

Ингибирование ферментов семейства JAK может ингибировать сигнализацию многих ключевых провоспалительных цитокинов. Таким образом, ингибиторы JAK возможно будут полезны в лечении язвенного колита и других воспалительных заболеваний, таких как болезнь Крона, аллергический ринит, астма и хроническое обструктивное легочное заболевание (COPD). Однако благодаря модулирующему эффекту JAK/STAT пути на иммунную систему системное воздействие ингибиторов JAK может иметь неблагоприятный системный иммуносупрессивный эффект. Поэтому было бы желательно обеспечить новые ингибиторы JAK, которые имеют эффект на участке их действия, без существенных системных эффектов. В частности, для лечения желудочно-кишечных воспалительных заболеваний, таких как язвенный колит, было бы желательно обеспечить новые ингибиторы JAK, которые можно вводить перорально и достигать терапевтически релевантного воздействия в желудочно-кишечном тракте с мини-

мальным системным воздействием.

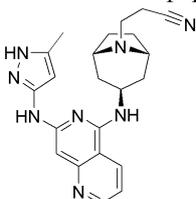
Сущность изобретения

Соответственно, изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию для лечения желудочно-кишечного воспалительного заболевания, включающую соединение формулы



или его фармацевтически приемлемую соль; микрокристаллическую целлюлозу; лактозу; стеарат магния.

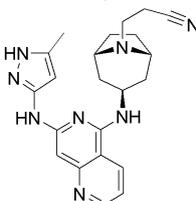
В другом аспекте изобретение обеспечивает способ лечения желудочно-кишечного воспалительного заболевания у человека, включающий введение человеку фармацевтической композиции, включающей терапевтически эффективное количество соединения формулы



или его фармацевтически приемлемой соли, и фармацевтически приемлемого носителя, причем C_{\max} у субъекта составляет меньше чем 100 нг/мл после введения человеку однократной дозы, содержащей до 1000 мг соединения, или меньше чем 30 нг/мл после введения человеку дозы, содержащей до 300 мг соединения в день в течение 14 дней.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию для лечения желудочно-кишечного воспалительного заболевания, включающую соединение формулы



или его фармацевтически приемлемую соль; микрокристаллическую целлюлозу; лактозу; стеарат магния.

В конкретном аспекте изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, в которой соединение находится в форме свободного основания.

В другом конкретном аспекте изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, в которой соединение присутствует в количестве от 1 до 400 мг.

В другом конкретном аспекте изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, в которой соединение присутствует в количестве от 5 до 300 мг.

В другом конкретном аспекте изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, в которой соединение присутствует в количестве от 20 до 70 мг.

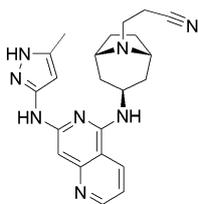
В другом конкретном аспекте изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, в которой соединение присутствует в количестве 10 мг.

В другом конкретном аспекте изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, в которой соединение присутствует в количестве 20 мг.

В другом конкретном аспекте изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, в которой соединение присутствует в количестве 40 мг.

В другом конкретном аспекте изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, в которой соединение присутствует в количестве 100 мг.

Настоящее изобретение обеспечивает способ лечения желудочно-кишечного воспалительного заболевания у человека, включающий введение человеку фармацевтической композиции, включающей терапевтически эффективное количество соединения формулы



или его фармацевтически приемлемой соли, и фармацевтически приемлемого носителя, причем C_{\max} у субъекта составляет меньше чем 100 нг/мл после введения человеку однократной дозы, содержащей до 1000 мг соединения, или меньше чем 30 нг/мл после введения человеку дозы, содержащей до 300 мг соединения в день в течение 14 дней.

В конкретном аспекте изобретение обеспечивает способ лечения, в котором C_{\max} у субъекта составляет меньше чем 50 нг/мл после введения человеку однократной дозы, содержащей до 1000 мг соединения.

В другом конкретном аспекте изобретение обеспечивает способ лечения, в котором субъекту вводят однократно дозу, содержащую 1000 мг соединения.

В другом конкретном аспекте изобретение обеспечивает способ лечения, в котором субъекту вводят 300 мг соединения в день в течение 14 дней, при этом C_{\max} меньше чем 30 нг/мл.

В другом конкретном аспекте изобретение обеспечивает способ лечения, в котором C_{\max} меньше чем 15 нг/мл после введения человеку дозы, содержащей до 300 мг соединения в день в течение 14 дней.

Определения

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

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

Термин "лечение", как он используется в настоящем документе, означает лечение заболевания, расстройства или медицинского состояния (такого как желудочно-кишечное воспалительное заболевание) у пациента, такого как млекопитающее (в частности, человек), которое включает одно или несколько из следующих:

(a) предотвращение возникновения заболевания, расстройства или медицинского состояния, т.е. предотвращение возникновения заболевания или медицинского состояния или профилактическое лечение пациента, который предрасположен к такому заболеванию или медицинскому состоянию;

(b) уменьшение интенсивности заболевания, расстройства или медицинского состояния, т.е. устранение или индукция регрессии заболевания, расстройства или медицинского состояния у пациента, включая противодействие эффектам других терапевтических средств;

(c) супрессия заболевания, расстройства или медицинского состояния, т.е. замедление или остановка развития заболевания, расстройства или медицинского состояния у пациента; или

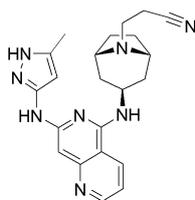
(d) облегчение симптомов заболевания, расстройства или медицинского состояния у пациента.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" означает соль, которая является приемлемой для введения пациенту или млекопитающему, такому как человек (например, соли, обладающие приемлемой безопасностью для млекопитающего при данной схеме введения). Репрезентативные фармацевтически приемлемые соли включают соли уксусной, аскорбиновой, бензолсульфоновой, бензойной, камфорсульфоновой, лимонной, этансульфоновой, эдисиловой, fumarовой, гентиизиновой, глюконовой, глюкуроновой, глутаминовой, гиппуровой, бромистоводородной, хлористоводородной, изетионовой, молочной, лактобионовой, малеиновой, яблочной, миндальной, метансульфоновой, муциновой, нафталинсульфоновой, нафталин-1,5-дисульфоновой, нафталин-2,6-дисульфоновой, никотиновой, азотной, оротовой, памовой, пантотеновой, фосфорной, янтарной, серной, винной, п-толуолсульфоновой и ксинафоевой кислот и т.п.

Фармацевтические композиции.

Соединения по настоящему изобретению и их фармацевтически приемлемые соли типично используют в форме фармацевтической композиции или состава. Такие фармацевтические композиции можно вводить пациенту любым приемлемым путем введения, включая, но не ограничиваясь этим, пероральный, ректальный, назальный, путем ингаляции, местный (включая чрескожный) и парентеральный пути введения.

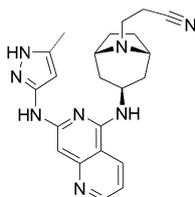
Соответственно, в одном из относящихся к композициям аспектов изобретение направлено на фармацевтическую композицию, включающую фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент и соединение формулы



или его фармацевтически приемлемую соль.

Необязательно, такие фармацевтические композиции могут содержать другие терапевтические средства и/или используемые для формулирования агенты, если это желательно.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению типично содержат терапевтически эффективное количество соединения формулы



Специалистам в данной области должно быть понятно, однако, что фармацевтическая композиция может содержать больше чем терапевтически эффективное количество, т.е. нерасфасованные композиции, или меньше чем терапевтически эффективное количество, т.е. отдельные стандартные дозы, предназначенные для нескольких введений для достижения терапевтически эффективного количества.

Типично, такие фармацевтические композиции будут содержать от около 0,1 до около 95 мас.% активного вещества; предпочтительно от около 5 до около 70 мас.% и более предпочтительно от около 10 до около 60 мас.% активного вещества.

Любой традиционный носитель или эксципиент можно использовать в фармацевтических композициях по настоящему изобретению. Выбор конкретного носителя или эксципиента или комбинаций носителей или эксципиентов будет зависеть от способа введения, используемого для лечения конкретного пациента, или типа медицинского состояния или болезненного состояния. В этой связи получение подходящей фармацевтической композиции для конкретного способа введения находится в пределах компетенции специалистов в области фармацевтики. Кроме того, носители или эксципиенты, используемые в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, являются коммерчески доступными. В качестве дополнительной иллюстрации традиционные методы формулирования композиций описаны в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000); и H.C. Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999).

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

Фармацевтические композиции типично получают путем тщательного и тесного смешивания или объединения активного вещества с фармацевтически приемлемым носителем и одним или несколькими необязательными ингредиентами. Полученную однородную смесь затем можно формовать или загружать в таблетки, капсулы, пилюли и т.п. с использованием традиционных процедур и оборудования.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению предпочтительно упаковывают в виде стандартной лекарственной формы. Термин "стандартная лекарственная форма" относится к физически дискретной единице, подходящей для введения дозы пациенту, т.е. каждая единица содержит предварительно определенное количество активного вещества, рассчитанное для обеспечения желаемого терапевтического эффекта либо отдельно, либо в комбинации с одной или несколькими дополнительными единицами. Например, такие стандартные лекарственные формы могут представлять собой капсулы, таблетки, пилюли и т.п. или стандартные упаковки, подходящие для парентерального введения.

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению являются подходящими для перорального введения. Подходящие фармацевтические композиции для перо-

рального введения могут быть в форме капсул, таблеток, пилюль, лепешек, саше, драже, порошков, гранул; или в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости; или в виде жидкой эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле; или в виде эликсира или сиропа; и т.п.; при этом каждая форма содержит предварительно определенное количество соединения по настоящему изобретению в качестве активного ингредиента.

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

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

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут быть сформулированы для обеспечения медленного или контролируемого высвобождения активного вещества с использованием в качестве примера гидроксипропилметилцеллюлозы в различных пропорциях или других полимерных матриц, липосом и/или микросфер. Кроме того, фармацевтические композиции по настоящему изобретению необязательно могут содержать опалесцирующие агенты и могут быть сформулированы таким образом, чтобы они высвобождали активный ингредиент только, или преимущественно, в определенной части желудочно-кишечного тракта, необязательно замедленным образом. Примеры композиций для заделки в них лекарственного средства, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски. Активное вещество также может быть в микроинкапсулированной форме, если это является подходящим, с одним или несколькими из вышеописанных эксципиентов.

Подходящие жидкие лекарственные формы для перорального введения включают в качестве иллюстрации фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Жидкие лекарственные формы типично включают активное вещество и инертный разбавитель, такой как, например, вода, или другие растворители, солюбилизующие вещества и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, масло семян хлопчатника, арахисовое, кукурузное, зародышей пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масло), олеиновая кислота, глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана и их смеси. Альтернативно, некоторые жидкие композиции можно преобразовать, например, путем распылительной сушки, в порошок, который используют для получения твердых лекарственных форм при помощи традиционных процедур.

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

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

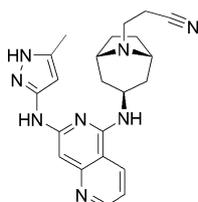
или подобное устройство доставки.

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

Следующие неограничивающие примеры иллюстрируют репрезентативные фармацевтические композиции по настоящему изобретению.

Пероральная твердая лекарственная форма в виде таблетки.

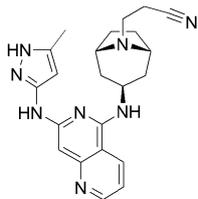
Соединение формулы



или его фармацевтически приемлемую соль подвергают сухому смешиванию с микрокристаллической целлюлозой, поливинилпирролидоном и кроскармеллозой натрия в соотношении 4:5:1:1 и путем прессования получают таблетки с получением стандартной лекарственной формы, например, 5, 20 или 40 мг активного вещества на таблетку.

Пероральная твердая лекарственная форма в виде капсулы.

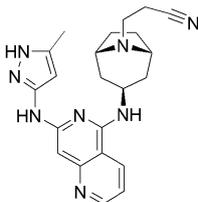
Соединение формулы



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

Пероральная твердая лекарственная форма в виде таблетки.

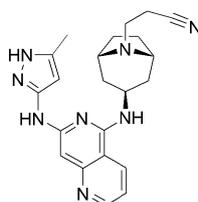
Соединение формулы



или его фармацевтически приемлемую соль подвергают сухому или мокрому гранулированию с микрокристаллической целлюлозой, лактозой, гидроксипропилметилцеллюлозой, кросповидоном и стеаратом магния. Композиция включает, в % мас./мас., соединение по настоящему изобретению (4%), микрокристаллическую целлюлозу (45%), лактозу (36%), гидроксипропилметилцеллюлозу (10%), кросповидон (3%) и стеарат магния (2%). Смеси, полученные сухим или мокрым гранулированием, прессуют в таблетки с получением стандартной лекарственной формы 10 мг активного вещества на 250 мг таблетку.

Пероральная твердая лекарственная форма в виде таблетки.

Соединение формулы



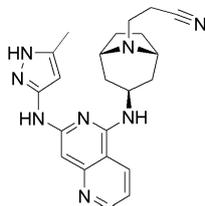
или его фармацевтически приемлемую соль подвергают сухому или мокрому гранулированию с микрокристаллической целлюлозой, гидроксипропилметилцеллюлозой, кросповидоном и стеаратом маг-

ния.

Композиция включает, в % мас./мас., соединение по настоящему изобретению (40%), микрокристаллическую целлюлозу (45%), гидроксипропилметилцеллюлозу (10%), кросповидон (3%) и стеарат магния (2%). Смеси, полученные сухим или мокрым гранулированием, прессуют в таблетки с получением стандартной лекарственной формы 100 мг активного вещества на 250 мг таблетку.

Жидкая лекарственная форма.

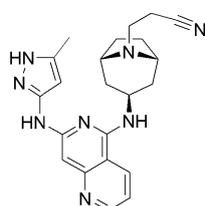
Жидкую лекарственную форму, включающую соединение формулы



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

Пероральная лекарственная форма с энтеросолюбильным покрытием.

Соединение формулы



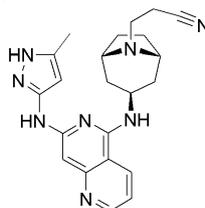
растворяют в водном растворе, содержащем поливинилпирролидон, и наносят путем распыления на гранулы из микрокристаллической целлюлозы или сахара в соотношении 1:5 мас./мас. активное вещество:гранулы и затем наносят энтеросолюбильное покрытие, дающее увеличение массы примерно 5%, которое включает акриловый сополимер, например комбинацию акриловых сополимеров, доступную под торговыми марками Eudragit-L® и Eudragit-S®, или гидроксипропилметилцеллюлозы ацетат сукцинат. Гранулы с энтеросолюбильным покрытием загружают в желатиновые или гидроксипропилметилцеллюлозные капсулы с получением стандартной лекарственной формы, например 30 мг активного вещества на капсулу.

Пероральная лекарственная форма с энтеросолюбильным покрытием.

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

Применимость.

Было показано, что соединение формулы



является сильным ингибиторами JAK семейства ферментов: JAK1, JAK2, JAK3 и TYK2.

Ингибирование семейства JAK ферментов может ингибировать передачу сигналов многих ключевых провоспалительных цитокинов. Таким образом, ожидают, что ингибиторы JAK по настоящему изобретению будут полезны в лечении воспалительных заболеваний, таких как язвенный колит, болезнь Крона, аллергический ринит, астма и хроническое обструктивное легочное заболевание (COPD).

Соединение по изобретению рассчитано так, чтобы их абсорбция была низкой, для минимизации системного воздействия. Как описано в экспериментальном разделе ниже, абсорбция и дистрибуция типичных соединений были широко профилированы в доклинических анализах.

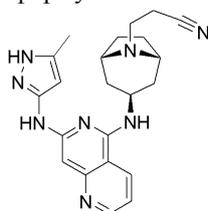
Оксазолон-индуцированный колит является экспериментальной моделью, которая имеет гистологическое сходство с язвенным колитом человека. Как описано ниже, соединение Примера 1, среди других соединений по изобретению, продемонстрировало активность в модели оксазолон-индуцированного колита у мышей. Кроме того, при испытании в модели иммуносупрессии у мышей, которая исследует системную функциональную активность, соединение продемонстрировало минимальный эффект иммуносупрессии при той же дозе, которая требуется для демонстрации эффективности в модели оксазолон. Таким образом, соединение продемонстрировало активность против колита без проявления системных

эффектов в доклинических моделях.

Ожидается, что высокое отношение толстая кишка:плазма, достигаемое этими соединениями, обеспечит надежную люминально-направленную противовоспалительную активность, без ассоциированных системно-направленных побочных эффектов.

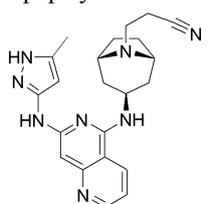
Ожидается, что соединения будут полезны для различных воспалительных показаний желудочно-кишечного тракта, которые включают, но не ограничиваются этим, язвенный колит (проктосигмоидит, панколит, язвенный проктит и левосторонний колит), болезнь Крона, коллагеновый колит, лимфоцитарный колит, болезнь Бехчета, целиакию, колит, вызванный лечением рака (например, колит, индуцированный ингибитором CTLA-4), илеит, эозинофильный эзофагит, колит, связанный с болезнью трансплантат-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), коллагеновый 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 болезнью 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), целиакия (de Nitto et al., *World J. Gastroenterol.*, 2009, 15, 4609-4614), колит, индуцированный лечением рака (например, колит, индуцированный ингибитором CTLA-4 (Yano et al., *J. Translation. Med.*, 2014, 12, 191), и илеит (Yamamoto et al., *Dig. Liver. Dis.*, 2008, 40, 253-259) характеризуются повышением уровней некоторых провоспалительных цитокинов. Поскольку многие провоспалительные цитокины передают сигналы через активацию JAK, соединения, описанные в настоящем документе, могут облегчать воспаление и обеспечивать облегчение симптомов.

В частности, ожидают, что соединение формулы

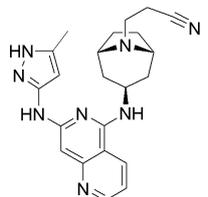


будет полезно для индукции и поддержания ремиссии язвенного колита и для лечения болезни Крона, CTLA-4 ингибитор-индуцированного колита и желудочно-кишечных побочных эффектов при болезни трансплантат-против-хозяина.

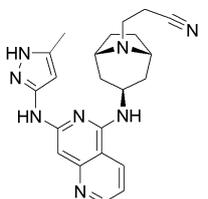
В одном аспекте изобретение поэтому обеспечивает способ лечения желудочно-кишечного воспалительного заболевания у млекопитающего (например, человека), включающий введение млекопитающему терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, включающей фармацевтически приемлемый носитель и соединение формулы



Изобретение также обеспечивает способ лечения язвенного колита у млекопитающего, включающий введение млекопитающему терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, включающей фармацевтически приемлемый носитель и соединение формулы



При использовании для лечения желудочно-кишечного воспалительного заболевания соединения формулы



обычно вводят перорально в виде одной суточной дозы или в виде нескольких доз в день, хотя могут использоваться другие формы введения.

Количество активного вещества, вводимого на дозу, или общее количество, вводимое в день, обычно определяется лечащим врачом в свете соответствующих обстоятельств, включая состояние, подлежащее лечению, выбранный способ введения, конкретное вводимое соединение и его относительную активность, возраст, массу тела и ответную реакцию конкретного пациента, тяжесть симптомов у пациента и т.п.

Ожидается, что подходящие дозы для лечения язвенного колита и других воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта могут варьироваться от около 1 до около 400 мг/день активного вещества, в том числе от около 5 до около 300 мг/день и от около 20 до около 70 мг в день активного вещества для человека со средней массой тела 70 кг.

Примеры

Следующий пример синтеза и биологические примеры представлены для иллюстрации изобретения. В примерах, представленных ниже, следующие аббревиатуры имеют следующие значения, если не указано иное. Аббревиатуры, не определенные ниже, имеют их общепринятые значения.

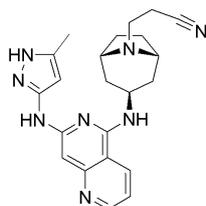
ACN =	ацетонитрил
DCM =	дихлорметан
DIPEA =	<i>N,N</i> -диизопропилэтиламин
DMF =	<i>N,N</i> -диметилформамид
DMSO =	диметилсульфоксид
EtOAc =	этилацетат
ч =	час (часы)
HATU=	<i>N,N,N',N'</i> -тетраметил- <i>O</i> -(7-азабензотриазол-1-ил) уроний гексафторфосфат
мин =	минута (минуты)
NMP =	<i>N</i> -метил-2-пирролидон
Pd(dppf)Cl ₂ =	дихлор (1, 1'-бис (дифенилфосфино) - ферроцен) дипалладий (II)
Pd ₂ (dba) ₃ =	трис (добензилиденацетон) дипалладий (0)
PdXPhos =	хлор (2-дициклогексилфосфино-2', 4', 6'-триизопропил-1, 1'-бифенил) [2-(2'-амино-1, 1'-бифенил)] палладий (II)
RT =	комнатная температура
Selectfluor =	1-хлорметил-4-фтор-1, 4-дiazoniabiцикло[2.2.2]октан бис (тетрафторборат)
TEA =	триэтиламин
TFA =	трифторуксусная кислота
THF =	тетрагидрофуран
бис (пинаколато) дибор =	4, 4, 5, 5, 4', 4', 5', 5'-октаметил-[2.2'] би[[1.3.2] диоксабороланил]
Xantphos =	4, 5-бис (дифенилфосфино) -9, 9-диметилксантен
Xphos =	Дициклогексилфосфино-2', 4', 6'-триизопропилбифенил

Реагенты и растворители закупали у коммерческих поставщиков (Aldrich, Fluka, Sigma и т.д.) и использовали без дополнительной очистки. Развитие реакции отслеживали при помощи тонкослойной

хроматографии (ТСХ), аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (анал. ВЭЖХ) и масс-спектрометрии. Реакционные смеси обрабатывали, как описано специально для каждой реакции; обычно их очищали путем экстракции и другими способами очистки, такими как температура- и растворитель-зависимая кристаллизация и осаждение. Кроме того, реакционные смеси обычно очищали колоночной хроматографией или препаративной ВЭЖХ, типично с использованием колонок с насадками C18 или BDS и традиционных элюентов. Типичные условия препаративной ВЭЖХ описаны ниже.

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

Пример 1. 3-((1R,3s,5S)-3-((7-((5-Метил-1H-пиразол-3-ил)амино)-1,6-нафтиридин-5-ил)амино)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-ил)пропаннитрил



В 20-мл сосуд добавляли N^5 -((1R,3s,5S)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)- N^7 -(5-метил-1H-пиразол-3-ил)-1,6-нафтиридин-5,7-диамин, 2TFA (462,4 мг, 0,80 ммоль), метанол (4 мл) и DIPEA (0,70 мл, 4,00 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 мин и затем медленно добавляли акрилонитрил (0,058 мл, 0,88 ммоль, 100 мл). Сосуд закрывали крышкой и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 ч, концентрировали, растворяли в 15% растворе уксусной кислоты в воде и очищали препаративной ВЭЖХ (метод 1). Фракции объединяли, лиофилизировали, растворяли в 15% растворе уксусной кислоты в воде и очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ. Фракции объединяли и лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения в виде ярко-красного твердого вещества (505 мг, выход 52%; чистота 98%).

(m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ рассчитано для $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_8$ 403,23 найдено 403,7.

Анализ 1. Биохимические анализы JAK и нецелевых киназ.

Панель из четырех LanthaScreen JAK биохимических анализов (JAK1, 2, 3 и Tyk2) осуществляли в обычном киназном реакционном буфере (50 mM HEPES, pH 7,5, 0,01% Brij-35, 10 mM MgCl_2 и 1 mM EGTA). Рекомбинантные GST-меченые JAK ферменты и GFP-меченый STAT1 пептидный субстрат получали от Life Technologies.

Серийно разведенные соединения предварительно инкубировали с каждым из четырех JAK ферментов и субстратом в белых 384-луночных микропланшетах (Corning) при температуре окружающей среды в течение 1 ч. Затем добавляли АТФ для инициирования киназной реакции в общем объеме 10 мл, с 1% DMSO. Конечные концентрации ферментов для JAK1, 2, 3 и Tyk2 были 4,2, 0,1, 1 и 0,25 нМ соответственно; соответствующие используемые концентрации K_m АТФ были 25, 3, 1,6 и 10 мкМ; тогда как концентрация субстрата была 200 нМ для всех четырех анализов. Киназным реакциям давали осуществиться в течение 1 ч при температуре окружающей среды перед добавлением 10 мкл препарата EDTA (конечная концентрация 10 нМ) и Tb-анти-pSTAT1 (pTyr701) антитела (Life Technologies, конечная концентрация 2 нМ) в TR-FRET буфере для разведения (Life Technologies). Инкубацию планшетов осуществляли при температуре окружающей среды в течение 1 ч, затем их считывали на Envision планшет-ридере (Perkin Elmer). Отношение сигналов эмиссии (520 нм/495 нм) регистрировали и использовали для расчета процента ингибирования на основании DMSO и фоновых контролей.

Для анализа доза-ответ проценты ингибирования наносили на график против концентраций соединений и значения IC_{50} определяли с использованием 4-параметрической модели надежной подгонки и программы Prism (GraphPad Software). Результаты выражали как pIC_{50} (отрицательный логарифм IC_{50}) и затем преобразовывали в pKi (отрицательный логарифм константы диссоциации, K_i) с использованием уравнения Ченга-Прусова.

Испытываемые соединения, имеющие более высокое значение pKi в каждом из четырех анализов JAK, показывали большее ингибирование активности JAK. Соединения по изобретению, испытанные в этом анализе, обычно демонстрировали значения pKi от около 7 до около 10,3.

Панель из анализов нецелевых тирозинкиназ (Flt3, RET, FGFR2, TrkA и pDGFR β) была разработана с использованием такой же методики, с рекомбинантными ферментами, полученными от Life Technologies, и биотинилированными пептидными субстратами, синтезированными в AnaSpec. Все анализы осуществляли при температуре окружающей среды с конечной АТФ концентрацией 100 мМ. Реагенты для детекции, включая Eu-анти-фосфотирозин (pY20) антитело и SureLight APC-SA, закупили у

Perkin Elmer. Отношение сигналов эмиссии (665 нм/615 нм) регистрировали и использовали для анализа данных и конечные результаты выражали как IC_{50} .

Анализ 2. Клеточный анализ активности JAK.

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

BEAS-2B клетки выращивали при 37°C в 5% CO₂ увлажненном инкубаторе в 50% DMEM/50% F-12 среды (Life Technologies), дополненной 10% FBS (Hyclone), 100 Ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Life Technologies) и 2 мМ GlutaMAX (Life Technologies). В день 1 анализа клетки высевали при плотности 7500 клеток/лунка в белые покрытые поли-D-лизином 384-луночные планшеты (Corning) с 25 мкл среды и оставляли для адгезии в течение ночи в инкубаторе. В день 2 анализа среду удаляли и заменяли 12 мл аналитического буфера (сбалансированный солевой раствор Хэнка/HBSS, 25 мМ HEPES и 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина/BSA), содержащего доза-ответы испытываемых соединений. Соединения серийно разводили в DMSO и затем еще 1000-кратно разбавляли в среде для доведения конечной DMSO концентрации до 0,1%. Клетки инкубировали с испытываемыми соединениями при 37°C в течение 1 ч с последующим добавлением 12 мкл предварительно нагретого IL-13 (80 нг/мл в аналитическом буфере) для стимуляции. После инкубации при 37°C в течение 30 мин аналитический буфер (содержащий соединение и IL-13) удаляли и добавляли 10 мкл буфера для лизиса клеток (25 мМ HEPES, 0,1% SDS, 1% NP-40, 5 мМ MgCl₂, 1,3 мМ EDTA, 1 мМ EGTA и дополненный коктейлем ингибиторов протеаз Complete Ultra mini и PhosSTOP от Roche Diagnostics). Планшеты встряхивали при температуре окружающей среды в течение 30 мин перед добавлением реагентов для детекции. Сначала добавляли смесь биотин-анти-pSTAT6 и анти-STAT6-конъюгированных акцепторных шариков и инкубировали при температуре окружающей среды в течение 2 ч, затем добавляли стрептавидин-конъюгированные донорные шарики (Perkin Elmer). После минимум 2 ч инкубации аналитические планшеты считывали на Envision планшет-ридере. AlphaScreen люминесцентные сигналы регистрировали и использовали для расчета процента ингибирования на основании DMSO и фоновых контролей.

Для анализа доза-ответ проценты ингибирования наносили на график против концентраций соединений и значения IC_{50} определяли с использованием 4-параметрической модели надежной подгонки и программы Prism. Результаты выражали как отрицательный логарифм IC_{50} значения, pIC_{50} .

Испытываемые соединения, имеющие более высокое значение IC_{50} в этом анализе, показывали большее ингибирование IL-13-индуцированного фосфорилирования STAT6. Соединения по изобретению, испытанные в этом анализе, обычно демонстрировали значения pIC_{50} от около 6,8 до около 8,5.

Анализ интерлейкин-4 (IL-4, R&D Systems)-индуцированного фосфорилирования STAT6 также осуществляли в THP-1 человеческих моноцитах (ATCC) с использованием таких же форматов анализа и реагентов для детекции. IL-4 стимуляцию осуществляли в течение 30 мин при конечной концентрации 30 нг/мл. Сбор данных и анализ также осуществляли аналогичным образом. Соединения по изобретению, испытанные в этом анализе, обычно демонстрировали значения pIC_{50} от около 6,8 до около 8,5.

Анализ 3. Анализ цитотоксичности.

CellTiter-Glo люминесцентный анализ клеточного выживания/цитотоксичности осуществляли в BEAS-2B эпителиальных клетках легкого человека (ATCC) в нормальных условиях роста.

Клетки выращивали при 37°C в 5% CO₂ увлажненном инкубаторе в 50% DMEM/50% F-12 среде (Life Technologies), дополненной 10% FBS (Hyclone), 100 Ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Life Technologies) и 2 мМ GlutaMAX (Life Technologies). В день 1 анализа клетки высевали при плотности 500 клеток/лунка в белые 384-луночные планшеты для культур тканей (Corning) с 25 мкл среды и оставляли для адгезии в течение ночи в инкубаторе. В день 2 анализа добавляли 5 мкл среды, содержащей доза-ответы испытываемых соединений, и инкубировали при 37°C в течение 48 ч. Затем добавляли 30 мл раствора для детекции CellTiter-Glo (Promega), смешивали на орбитальном встряхивающем устройстве в течение 5 мин и инкубировали еще в течение 10 мин, затем считывали на Envision планшет-ридере. Сигналы люминесценции регистрировали и рассчитывали процент от DMSO контроля.

Для анализа доза-ответ процент от DMSO контроля наносили на график против концентраций соединений для получения кривых доза-ответ по линии, соединяющей каждую точку данных. Концентрация, при которой каждая кривая пересекает 15%-ный порог ингибирования, определяется как CC_{15} . Результаты выражали как отрицательный логарифм CC_{15} значения, pCC_{15} .

Ожидается, что испытываемые соединения, имеющие более низкое значение pCC_{15} в этом анализе, имеют меньшую вероятность вызвать цитотоксичность. Соединения по изобретению, испытанные в этом анализе, обычно демонстрировали значения pCC_{15} от меньше чем 5 до около 6.

Анализ 4. Определение абсорбции у канюлированных крыс.

Пероральную биодоступность ($F\%$), абсорбированную фракцию ($F_a\%$) и фракцию, избегающую печеночный клиренс ($F_h\%$), определяли у Sprague Dawley крыс в следующих двух испытаниях:

(1) Фармакокинетика у крыс после в/в дозы испытываемого соединения: После в/в введения дозы образцы плазмы обычно собирали в промежутке между 0-6 ч. Уровни лекарственного средства определяли с использованием метода ЖХ-МС-МС. Полученные уровни лекарственного средства использовали для расчета в/в фармакокинетических параметров: AUC в.в. и доза в.в.

(2) Крысам, канюлированным в их воротную вену (PV), а также в их яремную вену (JV), вводили перорально испытываемое соединение. После перорального введения дозы образцы плазмы типично собирали в промежутке между 0-6 ч как из воротной вены, так и из яремной вены. Уровни лекарственного средства определяли с использованием метода ЖХ-МС-МС. Полученные уровни лекарственного средства использовали для расчета следующих фармакокинетических параметров: AUC п.о. PV, AUC п.о. JV и доза п.о.

С использованием данных, полученных в описанных выше испытаниях, пероральную биодоступность $F_a\%$ и $F_h\%$ рассчитывали из следующих формул:

$$F_a\% = (AUC \text{ п.о. JV} / AUC \text{ в.в.}) \times (\text{Доза в.в.} / \text{Доза п.о.}) \times 100$$

$$F_h\% = (AUC \text{ п.о. PV} / AUC \text{ в.в.}) \times (\text{Доза в.в.} / \text{Доза п.о.}) \times 100$$

$$F_h\% = AUC \text{ п.о. JV} / AUC \text{ п.о. PV}$$

где AUC п.о. JV = площадь под кривой после пероральной дозы и плазма, собранная из яремной вены;

AUC п.о. PV = площадь под кривой после пероральной дозы и плазма, собранная из воротной вены;

AUC в.в. = площадь под кривой после внутривенной дозы;

Доза в.в. = внутривенная доза в мг/кг;

Доза п.о. = пероральная доза в мг/кг.

3-((1R,3s,5S)-3-((7-((5-Метил-1H-пиразол-3-ил)амино)-1,6-нафтиридин-5-ил)амино)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-ил)пропаннитрил типично демонстрировал пероральную биодоступность ($F_a\%$) меньше чем около 5% и $F_h\%$ значения меньше чем около 10%.

Анализ 5. Фармакокинетика в толстой кишке крыс.

3-((1R,3s,5S)-3-((7-((5-Метил-1H-пиразол-3-ил)амино)-1,6-нафтиридин-5-ил)амино)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-ил)пропаннитрил индивидуально формулировали в 0,5% растворе метилцеллюлозы в воде и вводили через пероральный зонд при 5 мг/кг крысам Sprague Dawley. В различные моменты времени (обычно 1, 2, 4, 6, 24 ч) после дозирования брали образцы крови с помощью сердечной пункции и интактные толстые кишки вырезали у крыс. Образцы крови центрифугировали при 1500×g в течение 15 мин для сбора плазмы. Толстые кишки промывали ледяным фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), взвешивали и гомогенизировали при разведении 1:10 в PBS. Уровни испытываемого соединения в плазме и толстой кишке определяли при помощи ЖХ-МС анализа против аналитических стандартов, встроенных в стандартную кривую в тестовой матрице. Отношение содержания в толстой кишке к содержанию в плазме определяли как отношение AUC толстой кишки к AUC плазмы в мкг·ч/г. Например, 3-((1R,3s,5S)-3-((7-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)-1,6-нафтиридин-5-ил)амино)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-ил)пропаннитрил продемонстрировал отношение толстая кишка:плазма, превышающее примерно 450.

Анализ 6. Фармакокинетика в плазме и желудочно-кишечном тракте у крыс и собак.

3-((1R,3s,5S)-3-((7-((5-Метил-1H-пиразол-3-ил)амино)-1,6-нафтиридин-5-ил)амино)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-ил)пропаннитрил вводили самцам крыс Sprague Dawley (n=3), как описано в анализе 5. В каждый момент времени (0,5, 1, 3, 6 и 24 ч) брали образцы плазмы с помощью сердечной пункции и сразу после этого желудочно-кишечный тракт удаляли и следующие сегменты вырезали: двенадцатиперстную кишку, проксимальную ободочную кишку и дистальную ободочную кишку. Уровни испытываемого соединения в плазме и сегментах определяли, как описано в анализе 5. Во все моменты времени концентрация в плазме была ниже предела количественного определения 0,001 мкг/мл. Для 3-((1R,3s,5S)-3-((7-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)-1,6-нафтиридин-5-ил)амино)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-ил)пропаннитрила, для каждого сегмента, отношение ткани к плазме было больше чем примерно 14000.

Аналогичный эксперимент был проведен у собак. Самцам собак бигль (n=2) вводили через пероральный зонд 5 мг/кг испытываемого соединения, как указано выше. У собаки № 1 образцы плазмы брали в точке времени 0,25, 1, 2, 4, 6 и 24 ч после дозирования. У собаки № 2 образцы плазмы брали в точке времени 6 ч. Как у собаки № 1 (через 24 ч), так и у собаки № 2 (через 6 ч) желудочно-кишечный тракт удаляли и сегментировали следующим образом: двенадцатиперстная кишка, подвздошная кишка, слепая кишка и толстая кишка, разделенная на три равные части (проксимальный, средний и дистальный отдел толстой кишки). Для каждого из сегментов желудочно-кишечного тракта в середине сегмента вырезали кусок приблизительно 2 см. Каждый из них тщательно промывали в ледяном PBS буфере и затем гомогенизировали в 5 объемах PBS буфера и анализировали, как указано выше. Для соединения примера 1 отношение концентрации соединения в ткани желудочно-кишечного тракта к соединению в плазме для образцов, взятых через 6 ч после пероральной дозы, варьировалось от примерно 9 до примерно 165, при этом концентрацию в толстой кишке брали как сумму от трех сегментов толстой кишки. Отношение концентрации в желудочно-кишечном тракте к концентрации в плазме составляло от 7 до 30 для измере-

ний, которые проводили через 24 ч после пероральной дозы.

Анализ 7. Мышиная модель оксазолон-индуцированного колита.

Оксазолон-индуцированный колит представляет собой экспериментальную модель, которая имеет гистологическое сходство с язвенным колитом человека (Heller et al., *Immunology*, 2002, 17, 629-638). В анализе использовали взрослых Balb/C мышей от Harlan. В день 1 животных слегка анестезировали изофлураном и волоски между плечами тщательно удаляли перед тем, как оксазолон (4%, 150 мкл, в смеси 4:1 ацетон:оливковое масло) или раствор носителя медленно наносили для сенсibilизации кожи. Через семь дней после сенсibilизации кожи мыши голодали в течение ночи, их анестезировали ингаляцией изофлураном и 1-мл шприц, снабженный 3.5-F катетером, заполненным раствором оксазолон, осторожно вводили примерно на 4 см в толстую кишку мыши. После введения 50 мкл раствора оксазолон (1%, в смеси 1:1 этанол:вода) вводили очень медленно (более 30 с с использованием инъекционного насоса) в толстую кишку. Катетер удаляли и мышей держали вертикально (головой вниз) в течение 2 мин для гарантии, что весь раствор оксазолон остался внутри толстой кишки. Лечение лекарственным средством (п.о., два раза в день (BID) или три раза в день (TID)) или носителем начинали за день до интратректального (и.р.) введения оксазолон. Через два дня после интратректального введения оксазолон индекс активности болезни (DAI) оценивали с помощью не знающих о лечении экспериментаторов для каждой мыши в соответствии с критериями:

оценка консистенции стула (0 нормальный, 2 - жидкий, 4 - диарея);

общая оценка кровотечения (0 - отсутствие, 2 - оттенок крови, 4 - наличие);

оценка потери массы тела (0 - нет, 1 - от 1 до 5%, 2 - от 5 до 10%, 3 - от 10 до 20%, 4 - более 20%);

DAI = среднее от (оценка консистенции стула+общая оценка кровотечения+оценка потери массы тела).

Эффективность в этой модели подтверждается снижением DAI оценки по сравнению с оценкой животных, которых обрабатывали носителем. Соединение Примера 1 (3-((1R,3s,5S)-3-((7-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)-1,6-нафтиридин-5-ил)амино)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-ил)пропаннитрил), продемонстрировало статистически значимое снижение DAI оценки по сравнению с животными, которых обрабатывали носителем, в оксазолоновой модели при дозе 1, 3 и/или 10 мг/кг BID.

Анализ 8. Эффекты иммуносупрессии в природных киллерных (NK) клетках селезенки мыши.

Истощение клеток селезенки мыши является экспериментальной моделью иммуносупрессии (Kudlacz et al., *Am. J. of Transplantation*, 2004, 4, 51-57). Соединение Примера 1 (3-((1R,3s,5S)-3-((7-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)-1,6-нафтиридин-5-ил)амино)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-ил)пропаннитрил) оценивали в модели клеток селезенки мыши, следуя такой же схеме лечения, как в модели оксазолон-индуцированного колита (Анализ 7).

Для исследования использовали взрослых самцов мышей Balb/C (12-14 недель) от Harlan. Соединение (1, 10 и 100 мг/кг, BID) и тофацитиниб (30 мг/кг, BID) в качестве положительного контроля дозировали перорально в течение трех дней ранее не подвергавшимся экспериментам мышам. Селезенки собирали через 1 или 2 ч после последней дозы и сразу же измельчали для окрашивания подтипов клеток. Перед фиксацией флуорофор-меченые антитела для CD19 (FITC; В-клетки), CD3e (PE, пан-Т-клетки) и DX5 (APC; NK-клетки) инкубировали с образцами спленоцитов от каждого животного для возможности одновременного анализа % нескольких подтипов на проточном цитометре. Количество всех клеток селезенки для каждого животного измеряли с помощью карманного автоматизированного счетчика клеток Scepter™ 2.0.

Абсолютное количество популяции подтипов лимфоцитов (например, селезеночных В-, Т- и NK-клеток) рассчитывали как процент каждого подтипа на общее количество клеток селезенки для каждого животного. Односторонний ANOVA с апостериорным критерием Даннета использовали для сравнения количества селезеночных лимфоцитов в группах введения носителя и испытываемых соединений. Уровень α устанавливали при $p < 0,05$. Данные представляли как среднее \pm SEM для каждой группы.

Положительный контроль тофацитиниб (30 мг/кг, п.о., BID) зависел от дозы и значительно уменьшал количество NK клеток селезенки. В том же исследовании соединение Примера 1 (3-((1R,3s,5S)-3-((7-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)-1,6-нафтиридин-5-ил)амино)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-ил)пропаннитрил) не влияло на количество селезеночных NK клеток в дозах п.о. (BID) до 100 мг/кг (испытанная максимальная доза). Никакого эффекта лечения не наблюдали для популяций В- и Т-клеток ни с каким соединением.

Эти данные в сочетании с минимальной дозой 1 мг/кг, которая вызывала значительный антиколитический эффект в мышинной модели оксазолон-индуцированного колита (Анализ 7), позволяют рассчитать функциональный терапевтический индекс >100 для соединения Примера 1.

Анализ 9. Первый в испытании на людях для оценки безопасности, переносимости и фармакокинетики у здоровых субъектов.

Соединение Примера 1 (3-((1R,3s,5S)-3-((7-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)-1,6-нафтиридин-5-ил)амино)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-ил)пропаннитрил) оценивали в двойном слепом, рандомизированном, плацебо-контролируемом, с однократным повышением дозы (SAD) и многократным повышением

дозы (MAD) исследовании безопасности, переносимости и фармакокинетики у здоровых субъектов. Образцы для исследования фармакокинетики собирали после введения конечной дозы вплоть до 72 ч как для SAD испытания (после первой дозы), так и для MAD испытания (после 14 дней однократного ежедневного введения). В SAD испытании участвовали 5 групп, а в MAD испытании участвовали 4 группы в общей сложности 72 субъекта, из которых 71 прошел полный период дозирования.

Фармакокинетические (ПК) параметры в плазме определяли при помощи некомпартментного анализа с использованием WinNonLin Version 6.4.0 (Pharsight, St Louis, MO). ПК параметр в плазме, представленный здесь, является следующим.

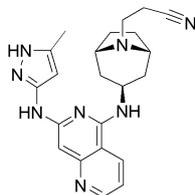
C_{max} : максимальная концентрация в плазме.

После однократной дозы до 1000 мг средняя концентрация соединения в плазме C_{max} составляла меньше чем 50 нг/мл, при этом ни у какого отдельного субъекта не достигалась C_{max} больше чем 100 нг/мл. После 14 дней введения соединения до 300 мг средняя концентрация соединения в плазме C_{max} составляла меньше чем 15 нг/мл, при этом ни у какого отдельного субъекта не достигалась C_{max} больше чем 30 нг/мл. Сравнение этих данных с другими пероральными вводимыми соединениями позволяет предположить, что соединение Примера 1 имеет очень низкую пероральную биодоступность. Кроме того, высокую концентрацию лекарственного средства наблюдали в образцах стула, что свидетельствует о значительном воздействии в желудочно-кишечном тракте.

Хотя настоящее изобретение было описано со ссылкой на его конкретные варианты осуществления, специалистам в данной области должно быть понятно, что возможны различные изменения и эквиваленты без отступления от действительной сущности и объема изобретения. Кроме того, можно осуществить множество модификаций для адаптации конкретной ситуации, материала, композиции вещества, способа, стадии или стадий способа к целям, сущности и объему настоящего изобретения. Все такие модификации предусматриваются как охватываемые объемом прилагаемой формулы изобретения. Кроме того, все публикации, патенты и патентные документы, на которые ссылаются выше, включены в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме, как если бы они были включены индивидуально посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

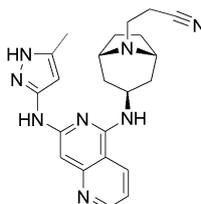
1. Фармацевтическая композиция для лечения желудочно-кишечного воспалительного заболевания, включающая соединение формулы



или его фармацевтически приемлемую соль; микрокристаллическую целлюлозу; лактозу; стеарат магния.

2. Композиция по п. 1, в которой соединение находится в форме свободного основания.
3. Композиция по п. 1 или 2, в которой соединение присутствует в количестве от 1 до 400 мг.
4. Композиция по п. 1 или 2, в которой соединение присутствует в количестве от 5 до 300 мг.
5. Композиция по п. 1 или 2, в которой соединение присутствует в количестве от 20 до 70 мг.
6. Композиция по п. 1 или 2, в которой соединение присутствует в количестве 10 мг.
7. Композиция по п. 1 или 2, в которой соединение присутствует в количестве 20 мг.
8. Композиция по п. 1 или 2, в которой соединение присутствует в количестве 40 мг.
9. Композиция по п. 1 или 2, в которой соединение присутствует в количестве 100 мг.

10. Способ лечения желудочно-кишечного воспалительного заболевания у человека, включающий введение человеку фармацевтической композиции, включающей терапевтически эффективное количество соединения формулы



или его фармацевтически приемлемой соли, и фармацевтически приемлемого носителя, причем C_{max} у субъекта составляет меньше чем 100 нг/мл после введения человеку однократной дозы, содержащей до 1000 мг соединения, или меньше чем 30 нг/мл после введения человеку дозы, содержащей до 300 мг соединения в день в течение 14 дней.

11. Способ по п.10, в котором C_{\max} у субъекта составляет меньше чем 50 нг/мл после введения человеку однократной дозы, содержащей до 1000 мг соединения.

12. Способ по п.10, в котором субъекту вводят однократно дозу, содержащую 1000 мг соединения.

13. Способ по п.10, в котором субъекту вводят 300 мг соединения в день в течение 14 дней, при этом C_{\max} меньше чем 30 нг/мл.

14. Способ по п.10, в котором C_{\max} меньше чем 15 нг/мл после введения человеку дозы, содержащей до 300 мг соединения в день в течение 14 дней.

