

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040576**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.28

(51) Int. Cl. *A61K 31/4439* (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

(21) Номер заявки
201892790

(22) Дата подачи заявки
2017.05.24

(54) ПРИМЕНЕНИЕ 2-ЗАМЕЩЕННЫХ ИНДАЗОЛОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И/ЛИ ПРОФИЛАКТИКИ НАРУШЕНИЙ, ОПОСРЕДОВАННЫХ IRAK4

(31) 16172507.2

(56) WO-A1-2015091426
WO-A1-2015104662
WO-A1-2015193846
WO-A1-2016083433
WO-A1-2016174183

(32) 2016.06.01

(33) EP

(43) 2019.06.28

(86) PCT/EP2017/062535

(87) WO 2017/207386 2017.12.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БАЙЕР ФАРМА
АКЦИЕНГЕЗЕЛЬШАФТ (DE)

(72) Изобретатель:
Рауш Александра, Йодль Штефан
Йоахим, Кречмар Йёрн, Боте Ульрих,
Шмидт Николь (DE)

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

(57) Изобретение относится к применению соединения, выбранного из: 11) N-[2-(3-гидрокси-3-метилбутил)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2H-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамид или 12) N-{6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2-[2-(метилсульфонил)этил]-2H-индазол-5-ил}-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамид, для приготовления лекарственного средства для лечения и/или профилактики опосредованного IRAK4 нарушения, выбранного из рассеянного склероза, аллергического контактного дерматита и аллергической экземы.

B1**040576****040576****B1**

Настоящая заявка относится к применению 2-замещенных индазолов для изготовления лекарственных средств для лечения и/или профилактики опосредованного IRAK4 нарушения, выбранного из рассеянного склероза, аллергического контактного дерматита и аллергической экземы.

Настоящее изобретение относится к применению замещенных индазолов, которые ингибируют ассоциированную с рецептором интерлейкин-1 киназу 4 (IRAK4), для применения в лечении аутоиммунных нарушений или дисфункций.

Человеческая IRAK4 (ассоциированная с рецептором интерлейкин-1 киназа 4) играет ключевую роль в активации иммунной системы. Поэтому, эта киназа является важной терапевтической молекулой-мишенью для разработки ингибирующих воспаление веществ. IRAK4 экспрессируется множеством клеток и опосредует сигнальную трансдукцию толл-подобных рецепторов (TLR), за исключением TLR3, и рецепторов семейства интерлейкина (IL)-1 β , состоящего из IL-1R (рецептор), IL-18R, IL-33R и IL-36R (Janeway and Medzhitov, *Annu. Rev. Immunol.*, 2002; Dinarello, *Annu. Rev. Immunol.*, 2009; Flannery and Bowie, *Biochemical Pharmacology*, 2010).

Ни IRAK4-нокаутные мыши, ни человеческие клетки пациентов с отсутствующей IRAK4 не реагируют на стимуляцию посредством TLR (за исключением TLR3) и семейства IL-1 β (Suzuki, Suzuki, et al., *Nature*, 2002; Davidson, Currie, et al., *The Journal of Immunology*, 2006; Ku, von Bernuth, et al., *JEM*, 2007; Kim, Staschke, et al., *JEM*, 2007).

Связывание лигандов TLR или лигандов семейства IL-1 β с соответствующим рецептором приводит к рекрутменту и связыванию MyD88 [ген первичного иммунного ответа миелоидной дифференцировки (88)] с рецептором. В результате этого MyD88 взаимодействует с IRAK4, что приводит к образованию активного комплекса, который взаимодействует с и активирует киназы IRAK1 или IRAK2 (Kollewe, Mackensen, et al., *Journal of Biological Chemistry*, 2004; Precious et al., *J. Biol. Chem.*, 2009). Вследствие чего активируется сигнальный путь NF (ядерный фактор)- κ B и сигнальный путь MARK (митоген-активируемая протеинкиназа) (Wang, Deng, et al., *Nature*, 2001). Активация как сигнального пути NF- κ B, так и сигнального пути MARK приводит к процессам, связанным с различными иммунными процессами. Например, увеличивается экспрессия различных воспалительных сигнальных молекул и ферментов, таких как цитокины, хемокины и COX-2 (циклооксигеназа-2), и повышается стабильность мРНК связанных с воспалением генов, например, COX-2, IL-6, IL-8 (Holtmann, Enninga, et al., *Journal of Biological Chemistry*, 2001; Datta, Novotny, et al., *The Journal of Immunology*, 2004). К тому же, эти процессы могут быть связаны с пролиферацией и дифференциацией конкретных типов клеток, например, моноцитов, макрофагов, дендритных клеток, Т-клеток и В-клеток (Wan, Chi, et al., *Nat Immunol*, 2006; McGettrick and J. O'Neill, *British Journal of Haematology*, 2007).

Аутоиммунные нарушения представляют собой заболевания, в которых иммунная система направлена против самого организма ("ауто"), тем самым атакуя здоровую эндогенную ткань. Дело в том, что иммунная система может быть направлена либо выборочно только против определенного органа (например, кишечника в случае язвенного колита, кожи в случае псориаза или нервов в случае рассеянного склероза), и тогда их классифицируют как так называемое органоспецифическое аутоиммунное нарушение, или же она направлена против всей системы, вызывая таким образом неорганоспецифическое системное аутоиммунное нарушение. В случае неорганоспецифического системного аутоиммунного нарушения, иммунная система атакует различные органы организма (например, в случае системной красной волчанки с реакциями в отношении кожи, суставов, почек и т.д.). Это неконтролируемое нарушение функции иммунной системы впоследствии приводит к хроническим воспалительным процессам в организме. Если аутоиммунное заболевание не лечат, то из-за серьезных воспалительных реакций пораженный орган разрушается, а в некоторых случаях с тяжелым течением (с системным вовлечением в патологический процесс), может привести и к смерти. Соответственно большое значение имеют ранняя диагностика и терапия.

Киназа IRAK4 или передача сигнала через IRAK4 играет центральную роль в лежащей в основе патологии многочисленных аутоиммунных расстройств (Chaudhary et al., *J Med Chem*, 2015). В частности, центральная роль IRAK4 была уже продемонстрирована путем прямого сравнения мышей дикого типа (WT) с генетически модифицированными животными, имеющими киназа-инактивированную форму IRAK4 (IRAK4 KDKI) в животной модели рассеянного склероза, где животные IRAK4 KDKI имели улучшенные симптомы РС (Staschke et al., *J Immunol*, 2009). Было также представлено, что экспрессия IRAK4 коррелирует со степенью синдрома Фогта-Коянаги-Харада (Sun, Yang, et al., *PLoS ONE*, 2014). Кроме того, была продемонстрирована высокая значимость IRAK4 для продуцирования опосредованного иммунным комплексом IFN α (интерферон-альфа) с помощью плазмцитоподобных дендритных клеток, ключевого процесса в патогенезе системной красной волчанки (СКВ) (Chiang et al., *J Immunol*, 2010). Помимо основной роли IRAK4 во врожденном иммунитете, также имеются указания на то, что IRAK4 влияет на дифференциацию так называемых Th17 Т-клеток, компонентов приобретенного иммунитета. При отсутствии киназной активности IRAK4, генерируется меньше IL-17-продуцирующих Т-клеток (Т-клеток Th17) по сравнению с мышами WT. Ингибирование IRAK4 позволяет проводить профилактику и/или лечение периферических артритов (таких как псориатический артрит, ревматоидный артрит, реак-

тивный артрит, системный юношеский идиопатический артрит), осевой артрит (в частности болезнь Бехтерева), саркоидоз, системная красная волчанка, псориаз, витилиго, гигантоклеточный артериит, атопический дерматит, аллергическая экзема/контактная аллергия, рассеянный склероз и хронические воспалительные заболевания кишечника (в частности, болезнь Крона и язвенный колит) (Staschke et al., *J Immunol*, 2009; Marquez, et al., *Ann Rheum Dis*, 2014; Zambrano-Zaragoza et al., *International Journal of Inflammation*, 2014; Ciccia et al., *Rheumatology*, 2015; Cinetto and Agostini, *Expert Rev Clin Immunol*, 2016; Lock et al., *Nat Med*, 2002; Esendagli et al., *J Neuroimmunol*, 2013; Brucklacher Waldert et al., *Brain*, 2009; Li et al., *J Neuroimmunol*, 2011; Zambrano-Zaragoza et al., *Int J Inflamm*, 2014; Geremia and Jewell, *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012; Kobayashi et al., *Gut*, 2008; Sugihara et al., *Clin Exp Immunol*, 2010; Fujino et al., *Gut*, 2003; Rovedatti et al., *Gut* 2009).

Вследствие главной роли IRAK4 в опосредованном MyD88 сигнальном каскаде TLR (за исключением TLR3) и семейства рецепторов IL-1, ингибирование IRAK4 может быть использовано для профилактики и/или лечения нарушений, опосредованных указанными рецепторами. TLR, а также компоненты семейства рецепторов IL-1, участвуют в патогенезе ревматоидного артрита, псориатического артрита, юношеского идиопатического артрита, тяжелой миастении, васкулита, например, болезни Бехчета и гигантоклеточного артериита, панкреатита, системной красной волчанки, дерматомиозита и полимиозита, сахарного диабета (1 и 2 типа), диабетической нефропатии, остеоартрита, синдрома Шегрена, болезни Стилла, рассеянного склероза и сепсиса (Yang, Tuzun, et al., *J Immunol*, 2005; Zhou et al., *Arthritis Rheum*, 2005; Candia, Marquez et al., *The Journal of Rheumatology*, 2007; Li, *Eur J Immunol*, 2008; Scanzello, Plaas, et al. *Curr Opin Rheumatol*, 2008; Deng, Ma-Krupa, et al., *Circ Res*, 2009; Roger, Froidevaux, et al, *PNAS*, 2009; Devaraj, Tobias, et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011; Ferraccioli et al., *Mol Med*, 2010; Kim, Cho, et al., *Clin Rheumatol*, 2010; Carrasco et al., *Clinical and Experimental Rheumatology*, 2011; Gambuzza, Licata, et al., *Journal of Neuroimmunology*, 2011; Fresno, *Archives Of Physiology And Biochemistry*, 2011; Volin and Koch, *J Interferon Cytokine Res*, 2011; Akash, Shen, et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012; Goh and Midwood, *Rheumatology*, 2012; Dasu, Ramirez, et al., *Clinical Science*, 2012; Ouziel, Gustot, et al., *Am J Pathol*, 2012; Ramirez and Dasu, *Curr Diabetes Rev*, 2012; Okiyama et al., *Arthritis Rheum*, 2012; Chen et al., *Arthritis Res Ther*, 2013; Liu et al., *Clin Rev Allergy Immunol*, 2013; Sedimbi, Hagglof et al., *Cell Mol Life Sci*, 2013; Van de Veerdonk et al., *Front Immunol*, 2013; Zarpelon et al., *Br J Pharmacol*, 2013; Caso, Costa, et al., *Mediators of Inflammation*, 2014; Cordiglieri, Marolda, et al., *J Autoimmun*, 2014; Jialal, Major, et al., *J Diabetes Complications*, 2014; Kaplan, Yazgan, et al., *Scand J Gastroenterol*, 2014; Talabot-Aye, et al., *Cytokine*, 2014; Zong, Dorph, et al., *Ann Rheum Di*, 2014; Timper, Seelig, et al., *J Diabetes Complications*, 2015).

Заболевания кожи, такие как псориаз, атопический дерматит, синдром Киндлера, буллезный пемфигоид, аллергический контактный дерматит, очаговая алопеция, инверсные угри и обыкновенные угри равным образом связаны с IRAK4-опосредованным TLR сигнальным путем или семейством IL-1R (Schmidt, Mitnacht, et al., *J Dermatol Sci*, 1996; Hoffmann, *J Invest Dermatol Symp Proc*, 1999; Gilliet, Conrad, et al., *Archives of Dermatology*, 2004; Niebuhr, Langnickel, et al., *Allergy*, 2008; Miller, *Adv Dermatol*, 2008; Terhorst, Kalali, et al., *Am J Clin Dermatol*, 2010; Viguiere, Guigue, et al., *Annals of Internal Medicine*, 2010; Carrier et al., *J Invest Dermatol*, 2011; Cevikbas, Steinhoff, *J Invest Dermatol*, 2012; Minkis, Aksentijevich, et al., *Archives of Dermatology*, 2012; Dispenza, Wolpert, et al., *J Invest Dermatol*, 2012; Minkis, Aksentijevich, et al., *Archives of Dermatology*, 2012; Liu et al., *Clin Rev Allergy Immunol*, 2013; Gresnigt and van de Veerdonk, *Seminars in Immunology*, 2013; Selway, Kurczab, et al., *BMC Dermatology*, 2013; Sedimbi, Hagglof, et al., *Cell Mol Life Sci*, 2013; Wollina, Koch, et al. *Indian Dermatol Online*, 2013; Foster, Baliwag, et al., *J Immunol*, 2014).

TLR, а также члены семейства IL-1R также дополнительно участвуют в патогенезе других воспалительных нарушений, таких как аллергия, болезнь Бехчета, кристаллические артропатии, такие как подагра, системная красная волчанка, болезнь Стилла взрослых и хронические воспалительные заболевания кишечника, такие как язвенный колит и болезнь Крона, и поэтому ингибирование IRAK4 является пригодным профилактическим и/или терапевтическим подходом (Liu-Bryan, Scott, et al., *Arthritis & Rheumatism*, 2005; Piggott, Eisenbarth, et al., *J Clin Inves*, 2005; Christensen, Shupe, et al., *Immunity*, 2006; Cario, *Inflammatory Bowel Diseases*, 2010; Nickerson, Christensen, et al., *The Journal of Immunology*, 2010; Rakoff-Nahoum, Hao, et al., *Immunity*, 2006; Heimesaat, Fischer, et al., *PLoS ONE*, 2007; Heimesaat, Nogai, et al., *Gut*, 2010; Kobori, Yagi, et al., *J Gastroenterol*, 2010; Schmidt, Raghavan, et al., *Nat Immunol*, 2010; Shi, Mucsi, et al., *Immunological Reviews*, 2010; Coccia et al., *J Exp Med*, 2012; Leventhal и Schroppel, *Kidney Int*, 2012; Chen, Lin, et al., *Arthritis Res Ther*, 2013; Hao, Liu, et al., *Curr Opin Gastroenterol*, 2013; Kreisel and Goldstein, *Transplant International*, 2013; Li, Wang, et al., *Pharmacology & Therapeutics*, 2013; Walsh, Carthy, et al., *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2013; Zhu, Jiang, et al., *Autoimmunity*, 2013; Yap and Lai, *Nephrology*, 2013; Vennegaard, Dyring-Andersen, et al., *Contact Dermatitis*, 2014; D'Elia, Brucato, et al., *Clin Exp Rheumatol*, 2015; Jain, Thongprayoon, et al., *Am J Cardiol*, 2015; Li, Zhang, et al., *Oncol Rep*, 2015).

В дополнение к уже упомянутым расстройствам, опосредованные IRAK4 процессы TLR были описаны в патогенезе воспалительных заболеваний глаз, таких как увеит, кератит и аллергический конъюнктивит (Li et al., *Curr Mol Med*, 2009; Bascherini et al., *Clin Rheumatol*, 2015; Sun and Pearlman, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2009; Redfern and McDermott, *Experimental Eye Research*, 2010; Kezic,

Taylor, et al., *J Leukoc Biol*, 2011; Chang, McCluskey, et al., *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 2012).

Из-за вовлечения сигналов TLR и опосредованных семейством рецептора IL-1 сигналов через IRAK4 в случае зуда и боли, включая острую, хроническую, воспалительную и невропатическую боль, можно предположить наличие терапевтического эффекта в случае указанных показаний в результате ингибирования IRAK4. Примеры боли включают гипералгезию, аллодинию, послеоперационную боль, невропатическую боль, боль в животе, боль, вызванную воспалением, боль в пояснице и хроническую боль (Wolf et al., *Brain Behav Imm*, 2008; Kim et al., *Toll-like Receptors: Roles in Infection and Neuropathology*, 2009; del Rey, Apkarian, et al., *Ann N Y Acad Sci*, 2012; Guerrero et al., *Eur J Pharmacol*, 2012; Kwok et al., *PLoS ONE*, 2012; Nicotra, et al., *Exp Neurol*, 2012; Chopra and Cooper, *J Neuroimmune Pharmacol*, 2013; David et al., *Neurobiol Dis*, 2013; Liu and Ji, *Pflugers Arch*, 2013; Stokes et al., *J Neuroinflammation*, 2013; Park, Stokes, et al., *Cancer Chemother Pharmacol*, 2014; Won et al., *J Pain*, 2014; Siddique and Khan, *Dig Dis Sci*, 2011; Schrepf et al., *Brain Behav Immun*, 2015).

Лечение воспалительных заболеваний, таких как CAPS (криопирин-ассоциированные периодические синдромы), включая FCAS (семейный холодовой аутовоспалительный синдром), MWS (синдром Макла-Уэльса), NOMID (мультисистемное воспалительное заболевание неонатального возраста) и синдром CONCA (хронический младенческий неврологический кожно-артикулярный); FMF (семейная средиземноморская лихорадка), HIDS (синдром гипер-IgD), TRAPS (периодический синдром, связанный с рецептором 1 фактора некроза опухолей), юношеский идиопатический артрит, болезнь Стилла взрослых, болезнь Адамантиада-Бехчета, ревматоидный артрит, остеоартрит, синдром Шнитцлера, синдром SAPHO (аббревиатура для синовита, акне, пустулезных высыпаний, гиперостоза и остита), синдром PAPA (аббревиатура для гнойного артрита, гангренозной пиодермии и акне), синдром PASS (аббревиатура для гангренозной пиодермии, обыкновенных угрей, гнойного гидраденита и анкилозирующего спондилита) и синдром Шегрена осуществляют с помощью блокирования сигнального пути IL-1; соответственно, в данном случае ингибитор IRAK4 также пригоден для лечения приведенных заболеваний (Narayanan et al., *Cornea* 2008; Brenner et al., *Br J Dermatol*, 2009; Henderson and Goldbach-Mansky, *Clin Immunol*, 2010; Dinarello, *European Journal of Immunology*, 2011; Gul, Tugal-Tutkun, et al., *Ann Rheum Dis*, 2012; Pettersson, *Annals of Medicine*, 2012; Ruperto et al., *N Engl J Med*, 2012; Nordstrom et al., *J Rheumatol*, 2012; Vijmasi et al., *Mol Vis*, 2013; Yamada et al., *Expert Opin Ther Target*, 2013; de Koning, *Clin Transl Allergy*, 2014). Лиганд IL-33R, IL-33, в особенности вовлечен в патогенез атопического дерматита и аллергической экземы/дерматита и болезни Бехтерева, и поэтому ингибирование IRAK4 для профилактики и/или лечения представляет собой приемлемый терапевтический подход (Li et al., *J Invest Med*, 2013; Theoharides et al., *J Pharmacol Exp Ther*, 2015; Saluja et al., *Clin Transl Allergy*, 2015; Firinu et al., *Curr Rheumatol Rep*, 2016; Leuenberger et al., *Dermatology*, 2016; Nygaard et al., *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2016; Omenetti et al., *Rheumatology (Oxford)*, 2016). Компоненты семейства рецептора IL-1 связаны с различными воспалительными расстройствами, такими как астма, ХОЗЛ, идиопатическая интерстициальная пневмония, аллергический ринит, фиброз лёгких, острый респираторный дистресс синдром (ARDS) и CRMO (хронический рецидивирующий мультифокальный остеомиелит), и поэтому профилактическое и/или терапевтическое действие следует ожидать в показаниях, указанных в результате ингибирования IRAK4 (Kang et al., *J Immunol*, 2007; Imaoka et al., *Eur Resp J*, 2008; Couillin et al., *J Immunol*, 2009; Lloyd, *Curr Opin Immunol*, 2010; Pauwels, et al., *Eur Respir J*, 2011; Haenuki, et al., *J Allergy Clin Immunol*, 2012; Yin, et al., *ClinExpImmunol*, 2012; Alexander-Brett, et al., *J Clin Invest*, 2013; Bunting, et al., *BioMed Res Int*, 2013; Byers, et al., *J Clin Invest*, 2013; Kawayama, et al., *J Interferon Cytokine Res*, 2013; Martinez-Gonzalez et al., *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013; Nakanishi et al., *PLoS ONE*, 2013; Qiu et al., *Immunol*, 2013; Li, et al., *J Allergy Clin Immunol*, 2014; Saluja, et al., *Mol Immunol*, 2014; Scianaro et al., *Pediatr Rheumatol Online*, 2014; Lugin et al., *J Immunol*, 2015).

В качестве стандартной терапии при аутоиммунных нарушениях, таких как рассеянный склероз, системная красная волчанка, псориаз и периферические артриты, используют иммунодепрессанты, которые существенно подавляют иммунную систему.

Текущая фармакологическая терапия рассеянного склероза (РС) следует различным подходам:

терапия острого криза РС, с применением высокодозированных системных стероидов, симптоматическая терапия посредством различных лекарственных средств, которые соответствуют симптомам и терапия для профилактики новых эпизодов РС. В этом случае применяют парентеральные (например, бета-интерфероны, ацетат глатирамера, натализумаб) и пероральные лекарственные средства (например, финголимод (диметилфумарат), терафлуномид), а также препараты кортизона (например, преднизолон или метилпреднизолон).

Для терапии системной красной волчанки (СКВ), используют иммунодепрессанты или иммуномодуляторы, такие как НПВВ, гидроксихлорохин, системные стероиды (глюкокортикоиды), микофенолат мофетил (ММФ), азатиоприн, лефлуномид, метотрексат, циклоспорин или циклофосфамид, часто в комбинации и в качестве интервальной/поддерживающей терапии, или белимумаб или ритуксимаб, антитела, применяемые парентерально.

Терапия псориаза зависит от степени тяжести и проводится с использованием стероидов для местного применения и аналогов витамина D3 (или их комбинации) или дитранола или ретиноида для мест-

ного нанесения, часто вместе с отшелушивающими соединениями (такими как салициловая кислота или мочевины), которые следует применять наружно, и фототерапия. В некоторых случаях также применяют ингибиторы кальцинейрина, такие как такролимус и пимекролимус. Доступны системные методы лечения, среди прочего, метотрексат, циклоспорин, сложные эфиры фумаровой кислоты, апремиласт, ретиноидные блокаторы ФНО и другие активные соединения. Также при лечении псориаза используют биологические препараты, такие как блокаторы ФНО (например, этанерцепт, инфликсимаб, адалимумаб, голимумаб и цертолизумаб пегол) или моноклональные антитела, ингибирующие интерлейкин, такие как устекинумаб и секукинумаб.

Для лечения атопического дерматита (нейродермита) и аллергической экземы используют стероиды, салициловую кислоту, мочевины, ингибиторы кальцинейрина, такие как такролимус, антибиотики (например, мупироцин), антигистамины, циклоспорин и фототерапию.

Для лечения артритов, таких как ревматоидный артрит, псориатический артрит и болезнь Бехтерева, помимо НПВВ (нестероидные противовоспалительные средства), гидроксихлорохина и стероидов (например, преднизона) пригодны так называемые химические лекарственные средства, модифицирующие течение заболевание (DMARDs), такие как метотрексат, сульфасалазин и лефлуномид, блокаторы ФНО и другие активные соединения. Для лечения артритов применяют биологические препараты, такие как блокаторы ФНО (инфликсимаб, адалимумаб, голимумаб и цертолизумаб пегол, а также этанерцепт), ритуксимаб, абатацепт или ингибирующие интерлейкин моноклональные антитела, такие как устекинумаб, тоцилизумаб и секукинумаб, или ингибиторы Jak/STAT, такие как тофацитиниб.

Пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями кишечника лечат, например, антибиотиками, такими как ципрофлоксацин и метронидазол, антидиуретическими средствами, такими как лопирамид или слабительными средствами (бисакодил) и пробиотическими бактериями (Mutaflor, VSL#3®, Lactobacillus GG, Lactobacillus plantarum, L. acidophilus, L. casei, Bifidobacterium infantis 35624, Enterococcus fecium SF68, Bifidobacterium longum, Escherichia coli Nissle 1917). Кроме того, пациенты отвечают на местное лечение стероидами (например, будесонидом) или системное лечение стероидами (например, преднизолоном). Кроме того, для лечения используют сульфасалазин, азатиоприн, меркаптопурин, метотрексат, циклоспорин, блокаторы ФНО (например, адалимумаб, этанерцепт) и антитела интегрина (например, ведолизумаб, натализумаб).

Однако известные терапевтические подходы не устраняют причину заболевания и могут привести к опасным для жизни инфекциям.

В некоторых случаях все описанные методы лечения могут вызывать серьезные побочные эффекты, например, остеопороз, отрицательные эффекты на уровне глюкозы (системные стероиды), в некоторых случаях летальные инфекции, реактивацию туберкулеза (блокаторы ФНО), повреждение органов (панкреатит, гепатит, пневмонит), инфузионные и инъекционные реакции, образование аутоантител (большинство парентеральных биологических препаратов), повышенный риск развития рака (блокаторы ФНО) и другие. Ни один из описанных методов лечения не лечит описанные заболевания, а очень частыми становятся новые эпизоды и обострения, в частности, когда прекращают терапию.

Задача настоящего изобретения состоит в том, чтобы предложить альтернативные варианты лечения аутоиммунных заболеваний, в частности, рассеянного склероза, аллергической экземы/контактного дерматита.

Рассматриваемую в настоящем изобретении задачу решают путем применения соединения, выбранного из:

11) N-[2-(3-гидрокси-3-метилбутил)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2Н-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида, или

12) N-{6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2-[2-(метилсульфонил)этил]-2Н-индазол-5-ил}-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида, для приготовления лекарственного средства для лечения и/или профилактики опосредованного IRAK4 нарушения, выбранного из рассеянного склероза, аллергического контактного дерматита и аллергической экземы.

Для целей настоящего изобретения под рассеянным склерозом (РС), который также называют рассеянным энцефаломиелитом (РЭ), следует понимать хроническое воспалительное заболевание центральной нервной системы, которое затрагивает головной и спинной мозг, и во время течения которого аутореактивной иммунной системой разрушаются нервные структуры, в частности миелиновая оболочка. В большинстве случаев проявление заболевания происходит в раннем взрослом возрасте, и это может привести к различным симптомам, таким как нарушение зрения, боль и/или паралич. Частота встречаемости рассеянного склероза среди женщин примерно в два раза выше, чем среди мужчин. До сих пор не существует лекарств от РС, но его течение может быть ослаблено путем применения лекарственных средств, таких как терифлуномид, диметилфумарат и финголимод. У каждого пациента течение РС может сильно отличаться. Двумя наиболее значительными формами прогрессирования РС являются эпизодическое и хронически прогрессирующее (прогрессирующее) течение болезни. Часто (примерно у 80% пациентов), в начальной стадии эпизодическое ремиттирующее течение (рецидивирующе-ремиттирующее, сокращенно РР-РС) позже сменяется на хронически прогрессирующее течение (вторично-прогрессирующее, сокращенно ВП-РС). Менее часто (примерно в 10% случаев РС) хронически прогрессирующее течение проис-

ходит даже в начале (первичный прогрессирующий, сокращённо ПП-РС), без каких-либо проявлений заболевания, которые были заметны заблаговременно.

Для целей настоящего изобретения, под системной красной волчанкой (СКВ) следует понимать хроническое и угрожающее жизни аутоиммунное расстройство, которое может приводить к множественным патологиям органов, кожным проявлениям (например, сыпь в форме бабочки) и заболеванию почек (волчаночный нефрит). При этом образование аутореактивных В-клеток, секретирующих анти-ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) и другие аутоантитела, приводит к образованию патогенетически значимых иммунных комплексов. Затем они могут активировать клетки иммунной системы, например, плазматоидные дендритные клетки (pDCs) через эндосомные специфические к нуклеиновым кислотам толл-подобные рецепторы (TLR), в частности TLR7 и TLR9. Это приводит к продуцированию интерферона I типа (такого как IFN-альфа и TNF- α) (Chen et al., *Clinic Rev Allerg Immunol*, 2015). В дополнение к IFN- α и TNF- α , у пациентов с СКВ также наблюдается значительное увеличение уровней IL-6 и IFN- γ в сыворотке по сравнению со здоровыми особями (Lyn-Cook et al., *Mol Immunol*, 2014). Кроме того, наблюдается увеличение частоты циркулирующих клеток ThH17 (Т-хелперных клеток типа 17) с последующим увеличением уровней IL-17 в сыворотке, оба из которых коррелируют со степенью тяжести заболевания (Zambrano-Zargoza et al., *Int J Inflamm*, 2014).

Для целей настоящего изобретения под псориазом следует понимать хроническое воспаление кожи с эпизодической прогрессией и повышенным шелушением кожи. Характерными признаками являются серебристо-белые округлые поражения кожи, которые сильно отслаиваются и преимущественно возникают на коленях, локтях и волосистой части головы. Пораженные участки очень часто зудят. Ответственной за развитие псориаза является хроническая воспалительная реакция, опосредованная клетками Th1 и Th17 (Т-хелперные клетки типа 1 или типа 17). Во время этой воспалительной реакции продуцируются провоспалительные цитокины, такие как IFN- γ , TNF- α , IL-23 и IL-17 (Deng et al., *Clin Rev Allergy Immunol*, 2016; Zambrano-Zargoza et al., *Int J Inflamm*, 2014; Chen et al., *Clinic Rev Allerg Immunol*, 2015). Это приводит к тому, что кератиноциты разрастаются и мигрируют в роговой слой кожи примерно в семь раз быстрее (вместо 28 дней у пациентов с псориазом это занимает всего 4 дня). Вследствие этого происходит быстрая регенерация эпидермиса. Помимо кожи часто также поражаются ногти, вызывая углубления и коричневатые пятна. Примерно у 25% пациентов также поражены суставы, что называют псориатическим артритом (Raychaudhuri et al., *Clin Rheumatol.*, 2015).

Для целей настоящего изобретения под атопическим дерматитом (нейродермит) и аллергической экземой следует понимать хроническое воспалительное заболевание кожи, связанное с зудом. В то время как аллергическая экзема является результатом специфической неадекватной чрезмерной реакции иммунной системы на внешний аллерген, который сам по себе не будет вреден для организма, напротив, в случае пациентов с нейродермитом защитная функция кожи уменьшается. У атопических пациентов контакт с физическими, химическими или микробными раздражителями может привести к воспалению. Атопический дерматит часто начинается в младенчестве и детстве и обычно прогрессирует эпизодами, которые могут чередоваться фазами с небольшим количеством симптомов, при наличии таковых (Malajian and Guttman-Yassky, *Cytokine*, 2015). Аллергические реакции, такие как аллергическая экзема, могут запускать или поддерживать атопический дерматит (Fischer et al., *Der Hautarzt*, 2003). У многих пациентов с нейродермитом может быть обнаружен повышенный уровень иммуноглобулина Е (IgE), который играет важную роль в аллергических реакциях. Аллергическая экзема требует выявления причин, то есть аллергена, посредством накожного теста, и затем огромное значение имеет исключение аллергена. Иммунная реакция типа Th2 является общей для воспалительных кожных заболеваний, то есть из-за контакта с аллергеном или из-за недостаточного кожного барьера и таким образом проникновения, например, бактерий, аутореактивная иммунная система у этих пациентов стимулируется посредством TLR или рецепторов семейства IL-1, что приводит к активации Th2-клеток. Вследствие этого иммунного ответа продуцируются провоспалительные цитокины, такие как IL-4, IL-5, IL-13, IL-18, IL-33 и т.д. (Kaesler et al., *J Allergy Clin Immunol*, 2014; Panzer et al., *Exp Dermatol*, 2014; Skabytska et al., *J Dtsch Dermatol Ges*, 2016; Paul, *Cytokine*, 2015; Malajian and Guttman-Yassky, *Cytokine*, 2015; McKenzie, *Ann Am Thorac Soc*, 2014).

Для целей настоящего изобретения под артритом (псориатический артрит, ревматоидный артрит, реактивный артрит, болезнь Бехтерева, системный юношеский идиопатический артрит) следует понимать воспалительное заболевание суставов. При этом, осевой артрит, характеризующийся воспалением позвоночных суставов (например, болезнь Бехтерева) отличается от периферического артрита, при котором главным образом поражены суставы конечностей, такие как пальцев ног, голеностопные суставы, коленей, пальцев рук, кистей или же локтей. В данном случае периферический артрит может быть симметричным, т.е. поражены те же суставы обеих сторон тела (например, ревматоидный артрит) или же асимметричным, т.е. воспаленные суставы распределены неравномерно по обеим сторонам тела (например, псориатический артрит). В этом случае подвижность воспаленных суставов ограничена и сопровождается болью, а кожа сверху имеет покраснения и является гипертермической. Заболевания артрита характеризуются эпизодической прогрессией, которая может привести к разрушению сус-

тавов и к серьезному ограничению дееспособности, вплоть до инвалидности. Аутореактивные В-клетки, клетки Th1 и клетки Th7, а также провоспалительные цитокины, такие как IFN- γ , TNF, IL-6, IL-12, IL-23 и IL-17 играют основную роль в индукции, а также в прогрессировании патологических процессов артрита. Эти иммунные клетки также вызывают продуцирование металлопротеиназ, так же, как и созревание и активацию остеокластов, что затем приводит к разрушению хряща и кости в пораженном суставе (Raychaudhuri et al., Clin Rheumatol, 2015; Burmester et al., Ann Rheum Dis, 2015; Furst and Emery, Rheumatol, 2014; McInnes и Schett, Engl J Med, 2011).

Для целей настоящего изобретения хроническое воспалительное заболевание кишечника (IBD) с его основными формами болезни Крона и язвенного колита следует понимать как означающее эпизодическое воспаление желудочно-кишечного тракта, которое может сохраняться в течение всей жизни. Хотя болезнь Крона и язвенный колит имеют много патологических характеристик и клинических симптомов (таких как кровавая диарея с коликами в животе, сопровождающиеся потерей веса), они также различаются во многих аспектах. В то время как в случае болезни Крона воспаление может возникать во всем желудочно-кишечном тракте от полости рта до заднего прохода, в случае пациентов с язвенным колитом оно ограничивается ободочной кишкой. Кроме того, в случае болезни Крона распространение воспаления кишечника является более неравномерным, то есть чередуются здоровые и воспаленные участки, тогда как в случае язвенного колита воспаление равномерно распространяется от заднего прохода по ободочной кишке. К тому же, также могут присутствовать симптомы вне желудочно-кишечного тракта, например в суставах и коже, а также воспаления печени. Помимо этого, у пациентов с язвенным колитом в особенности повышен риск развития колоректального рака (Geremia et al., Autoimmunity Rev, 2014). Оба заболевания встречаются чаще в возрасте от 20 до 40 лет, однако болезнь может также поражать детей и подростков. Хронические воспалительные заболевания кишечника не поддаются лечению; однако частота и интенсивность эпизодов заболевания могут быть снижены путем лечения лекарственными средствами, например, сульфасалазином, стероидами или биологическими препаратами (такими как антитела анти-ФНО) и посредством изменения образа жизни.

В случае описанных ниже промежуточных продуктов синтеза и демонстрационных примеров изобретения любое соединение, указанное в форме соли соответствующего основания или кислоты, обычно представляет собой соль неизвестного точного стехиометрического состава, полученного соответствующим способом получения и/или очистки. Поэтому, если не указано более подробно, дополнения к названиям и структурным формулам, таким как "гидрохлорид", "трифторацетат", "натриевая соль" или "x HCl", "x CF₃COOH", "x Na⁺" не следует понимать в стехиометрическом смысле в случае таких солей, но они носят описательный характер в отношении присутствующих в них солеобразующих компонентов.

Это же соответствующим образом относится и к случаю, когда промежуточные продукты синтеза или демонстрационные примеры или их соли были получены в форме сольватов, например, гидратов, неизвестного стехиометрического состава (если они определенного типа) описанными способами получения и/или очистки.

Под соединениями в соответствии с изобретением понимают соединения как таковые, а также их соли, сольваты и сольваты солей, соединения, в соответствии с изобретением и имеющие формулы, указанные ниже и их соли, сольваты и сольваты солей и соединения в соответствии с изобретением и которые упоминаются ниже в качестве вариантов осуществления и их соли, сольваты и сольваты солей, если соединения в соответствии с изобретением и указаны ниже, еще не являются солями, сольватами и сольватами солей.

Предпочтительными солями в контексте настоящего изобретения являются физиологически приемлемые соли соединений в соответствии с изобретением. Тем не менее, изобретение также охватывает соли, которые сами непригодны для фармацевтических применений, но которые можно применять, например, для выделения или очистки соединений в соответствии с изобретением.

Физиологически приемлемые соли соединений в соответствии с изобретением включают кислотнo-аддитивные соли минеральных кислот, карбоновых кислот и сульфоновых кислот, например, соли хлористоводородной кислоты, бромистоводородной кислоты, серной кислоты, фосфорной кислоты, метансульфоновой кислоты, этансульфоновой кислоты, толуолсульфоновой кислоты, бензолсульфоновой кислоты, нафталиндисульфоновой кислоты, уксусной кислоты, трифторуксусной кислоты, пропионовой кислоты, молочной кислоты, винной кислоты, яблочной кислоты, лимонной кислоты, фумаровой кислоты, малеиновой кислоты и бензойной кислоты.

Физиологически приемлемые соли соединений в соответствии с изобретением также включают соли обычных оснований, в качестве примера и с предпочтением - соли щелочных металлов (например, соли натрия и калия), соли щелочноземельных металлов (например, соли кальция и магния) и соли аммония - производные аммиака или органических аминов, содержащих от 1 до 16 атомов углерода, в качестве примера и с предпочтением - этиламина, диэтиламина, триэтиламина, этилдиизопропиламина, моноэтаноламина, диэтаноламина, триэтаноламина, дициклогексиламина, диметиламиноэтанола, прокаина, дибензиламина, N-метилморфолина, аргинина, лизина, этилендиамина и N-метилпиперидина.

Сольваты в контексте изобретения описаны в тех формах соединений в соответствии с изобретением, которые в твердом или жидком состоянии образуют комплекс путем координации с молекулами рас-

творителя. Гидраты являются особой формой сольватов, в которых координация происходит с водой.

Соединения в соответствии с изобретением, в зависимости от их структуры, могут существовать в различных стереоизомерных формах, т.е. в форме конфигурационных изомеров или же необязательно в виде конформационных изомеров (энантиомеров и/или диастереомеров, включая таковые в случае атропоизомеров). Следовательно, настоящее изобретение охватывает энантиомеры и диастереомеры, и их соответствующие смеси. Стереоизомерно однородные составные части можно выделить из таких смесей энантиомеров и/или диастереомеров известным способом; для этой цели предпочтительно применяют хроматографические способы, особенно ВЭЖХ хроматографию на ахиральной или хиральной фазе.

Если соединения в соответствии с изобретением могут встречаться в таутомерных формах, то настоящее изобретение охватывает все таутомерные формы.

Соединения в соответствии с изобретением могут также находиться в форме всех пригодных изотопных вариантов соединений в соответствии с изобретением. Изотопный вариант соединения в соответствии с изобретением в данном случае понимают в значении соединения, в котором по меньшей мере один атом в рамках такого соединения в соответствии с изобретением заменен на другой атом того же атомного номера, но с атомной массой, отличающейся от атомной массы, которая обычно или преимущественно встречается в природе. Примерами изотопов, которые можно включить в соединение в соответствии с изобретением являются изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, серы, фтора, хлора, брома и йода, такие как ^2H (дейтерий), ^3H (тритий), ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{32}P , ^{33}P , ^{33}S , ^{34}S , ^{35}S , ^{36}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{82}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{129}I и ^{131}I . Особые изотопные варианты соединения в соответствии с изобретением, особенно варианты, в которые включены один или несколько радиоактивных изотопов, могут быть полезными, например, для исследования механизма действия или распределения активного ингредиента в организме; вследствие сравнительной легкости получения и обнаружения, для этой цели пригодны особенно соединения, меченные изотопами ^3H или ^{14}C . Кроме того, введение изотопов, например, дейтерия, может приводить к особым терапевтическим преимуществам в результате большей метаболической стабильности соединения, например, к удлинению периода полураспада в организме или к снижению требуемой активной дозы; следовательно, такие модификации соединений в соответствии с изобретением могут в некоторых случаях также составлять предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения. Изотопные варианты соединений в соответствии с изобретением могут быть получены способами, известными специалисту в данной области техники, например, с помощью методов, описанных ниже, и методик, описанных в демонстрационных примерах, путем использования соответствующих изотопных модификаций соответствующих реагентов и/или исходных соединений.

Термин соединений в соответствии с изобретением дополнительно также охватывает пролекарства соединений в соответствии с изобретением. Термин "пролекарства" в данном контексте относится к соединениям, которые сами могут быть биологически активными или неактивными, но которые превращаются (например, метаболически или гидролитически) в соединения в соответствии с изобретением во время их удержания в организме.

В контексте настоящего изобретения, если не указано иное, заместители имеют следующие значения:

Алкил в контексте изобретения представляет собой алкильный радикал с прямой или разветвленной цепью, содержащий указанное конкретное число атомов углерода. Примеры включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, 1-метилпропил, 2-метилпропил, трет-бутил, н-пентил, 1-этилпропил, 1-метилбутил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, 2,2-диметилпропил, н-гексил, 1-метилпентил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-метилпентил, 1-этилбутил и 2-этилбутил. Предпочтение отдают метилу, этилу, н-пропилу, н-бутилу, 2-метилбутилу, 3-метилбутилу и 2,2-диметилпропилу.

Циклоалкил в контексте изобретения представляет собой моноциклический насыщенный алкильный радикал, содержащий указанное в каждом случае число атомов углерода. Предпочтительные примеры включают циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил.

Алкокси в контексте изобретения представляет собой алкокси-радикал с прямой или разветвленной цепью, содержащий указанное конкретное число атомов углерода. Предпочтительны от 1 до 6 атомов углерода. Примеры включают метокси, этокси, н-пропокси, изопропокси, 1-метилпропокси, н-бутокси, изобутокси, трет-бутокси, н-пентокси, изопентокси, 1-этилпропокси, 1-метилбутокси, 2-метилбутокси, 3-метилбутокси и н-гексокси. Особое предпочтение отдают линейному или разветвленному алкокси-радикалу, содержащему от 1 до 4 атомов углерода. Примеры, которые могут быть упомянуты как предпочтительные, представляют собой метокси, этокси, н-пропокси, 1-метилпропокси, н-бутокси и изобутокси.

Галоген в контексте изобретения означает фтор, хлор и бром. Предпочтение отдают фтору.

Гидроксил в контексте изобретения означает OH.

Моноциклический насыщенный гетероцикл представляет собой моноциклический насыщенный гетероцикл, который имеет от 4 до 6 кольцевых атомов и содержит гетероатом или гетерогруппу из группы O, S, SO и SO₂. Предпочтительным является гетероцикл, содержащий гетероатом или гетерогруппу из группы O, SO и SO₂. Примеры включают: оксетан, тетрагидрофуран, тетрагидро-2Н-пиран-4-ил, 1,1-диоксидотетрагидро-2Н-тиопиран-3-ил, 1,1-диоксидотетрагидро-2Н-тиопиран-2-ил, 1,1-диоксидотетра-

гидро-2Н-тиопиран-4-ил, 1,1-диоксидотетрагидротиофен-3-ил, 1,1-диоксидотетрагидротиофен-2-ил, 1,1-диоксидотиэтан-2-ил или 1,1-диоксидотиэтан-3-ил. В данном случае особое предпочтение отдают оксетану и тетрагидрофурану. Наибольшее предпочтение отдают оксетан-3-илу.

Символ * на связи обозначает точку присоединения в молекуле.

Когда радикалы в соединениях в соответствии с изобретением замещены, то такие радикалы могут быть моно- или полизамещены, если не указано иное. В контексте настоящего изобретения, все радикалы, встречающиеся более одного раза, определены независимо друг от друга. Предпочтительным является замещение одним, двумя или тремя одинаковыми или различными заместителями.

Предпочтительный вариант осуществления R представляет собой C₂-C₆-алкильный радикал, замещенный 1, 2 или 3 атомами фтора. Особое предпочтение отдают 2,2,2-трифторэтилу, 3,3,3-трифторпропилу и 4,4,4-трифторбутилу. Наиболее предпочтительным является 4,4,4-трифторбутильный радикал.

Другим, предпочтительным вариантом осуществления R¹ является C₂-C₆-алкильный радикал, замещенный одной или двумя гидроксильными группами или одним C₁-C₃-алкокси или три-фторзамещенным C₁-C₃-алкокси. Особенно предпочтительным является C₂-C₅-алкильный радикал, замещенный гидроксильной группой или посредством C₁-C₃-алкокси или трифторметокси или 2,2,2-трифторэтокси. Наиболее предпочтительным является 3-гидрокси-3-метилбутил, 3-метоксипропил, 3-гидроксипропил, 3-трифторметоксипропил, 2-метоксиэтил или 2-гидоксиэтил. В особенности предпочтительным является 3-гидрокси-3-метилбутильный радикал.

Кроме того, предпочтительно, R¹ представляет собой C₂-C₆-алкильный радикал, замещенный C₁-C₆-алкил-SO₂ группой. Особенно предпочтительным является метил-SO₂-замещенный C₂-C₄-алкильный радикал. В особенности предпочтительными для R¹ являются 2-(метилсульфонил)этил или 3-(метилсульфонил)пропил. Из последней группы особенно предпочтительным является 2-(метилсульфонил)этил.

Дополнительно предпочтительно, R¹ представляет собой C₁-C₃-алкильный радикал, замещенный оксетанилом, тетрагидрофуранилом, тетрагидро-2Н-пиран-4-илом, 1,1-диоксидотетрагидро-2Н-тиопиран-3-илом, 1,1-диоксидотетрагидро-2Н-тиопиран-2-илом, 1,1-диоксидотетрагидро-2Н-тиопиран-4-илом, 1,1-диоксидотетрагидротиофен-3-илом, 1,1-диоксидотетрагидротиофен-2-илом, 1,1-диоксидотиэтан-2-илом или 1,1-диоксидотиэтан-3-илом. Особенно предпочтительным является C₁-C₃-алкильный радикал, замещенный оксетановой группой. В особенности предпочтительной для R¹ является оксетан-3-илметильная группа.

Для R² и R³, которые всегда имеют одно и то же определение, предпочтительными являются водород или метил. Особенно предпочтительным является метил.

В случае с R⁴ предпочтительным является незамещенный или моно- или полигалогензамещенный C₁-C₃-алкильный радикал или C₁-C₃-алкильный радикал, замещенный одной гидроксильной группой или C₁-C₃-алкильный радикал, замещенный одной гидроксильной группой и тремя атомами фтора.

Для R⁴ особое предпочтение отдают нижеследующим радикалам: метил, этил, трифтор-C₁-C₃-алкил, дифтор-C₁-C₃-алкил, гидроксиметил, 1-гидроксиэтил, 2-гидроксипропан-2-ил и 2,2,2-трифтор-1-гидроксиэтил. Для R⁴ особое предпочтение отдают металльным, трифторметильным и дифторметильным радикалам. При этом особое предпочтение отдают трифторметильному радикалу.

Предпочтительный вариант осуществления R⁵ представляет собой водород, фтор, хлор или C₁-C₃-алкил. Более предпочтительно R⁵ представляет собой водород, фтор или метил. Наиболее предпочтительно R⁵ представляет собой водород или фтор.

Также особое предпочтение отдают соединениям, в которых R⁴ представляет собой метил или трифторметил и R⁵ означает фтор. Наиболее предпочтительными являются соединения, в которых R⁴ представляет собой метил и R⁵ означает фтор, где R⁵ находится в орто-положении к R⁴.

Для R⁶ предпочтительные варианты осуществления включают оксетанил, тетрагидрофуранил, тетрагидро-2Н-пиран-4-ил, 1,1-диоксидотетрагидро-2Н-тиопиран-3-ил, 1,1-диоксидотетрагидро-2Н-тиопиран-2-ил, 1,1-диоксидотетрагидро-2Н-тиопиран-4-ил, 1,1-диоксидотетрагидротиофен-3-ил, 1,1-диоксидотетрагидротиофен-2-ил, 1,1-диоксидотиэтан-2-ил или 1,1-диоксидотиэтан-3-ил. При этом особое предпочтение отдают оксетанилу. Наиболее предпочтительным является оксетан-3-ил.

R⁷ исключительно связан с функциональными группами -SO₂- и -SO-, т.е. означает R⁷-замещенную -SO₂- или SO группу. В этой связи R⁷ означает предпочтительно C₁-C₄-алкил, где C₁-C₄-алкильный радикал является незамещенным или монозамещенным посредством гидроксила или циклопропила или замещен тремя атомами фтора. Дополнительно предпочтительно R⁷ означает циклопропильный радикал. В особенности предпочтительно R⁷ представляет собой метил, этил или гидроксиэтил. Наиболее предпочтительным для R⁷ является метил.

Это означает, что в случае C₁-C₆-алкильного радикала, замещенного посредством R⁷SO₂- или R⁷SO-, в контексте R¹, предпочтение отдают C₁-C₆-алкилу, замещенному посредством C₁-C₆-алкил-SO₂ или C₁-C₆-алкил-SO. При этом, для R¹ предпочтение отдают в особенности метилсульфонилэтилу и метилсульфонилпропилу. Причем наибольшее предпочтение отдают метилсульфонилэтилу.

Для R⁸ предпочтение отдают незамещенному C₁-C₄-алкильному радикалу или трифтор-

замещенному C₁-C₄-алкильному радикалу. Особое предпочтение отдают метилу, этилу, трифторметилу или 2,2,2-трифторэтилу. Наиболее предпочтительным является метил, трифторметил или 2,2,2-трифторэтил.

Также предусмотрена профилактика и/или лечение боли, в особенности острой, хронической, воспалительной и невропатической боли, при помощи соединений по изобретению.

К тому же, соединения по изобретению пригодны для лечения и/или профилактики болевых расстройств, в особенности острой, хронической, воспалительной и невропатической боли. Преимущественно они включают такие, как гипералгезия, аллодиния, боль в пояснице и хроническая боль.

В контексте настоящего изобретения, термин "лечение" или "проведение лечения" включает ингибирование, замедление, контроль, облегчение, ослабление, ограничение, уменьшение, подавление, преодоление или излечение заболевания, состояния, расстройства, повреждения или проблемы со здоровьем, или развития, течения или прогрессирования таких состояний и/или симптомов таких состояний. При этом термин "терапия" следует понимать как синоним термина "лечение".

Термины "предупреждение", "профилактика" и "предотвращение" в контексте настоящего изобретения использованы как синонимы и относятся к предотвращению или снижению риска заразиться, перенести, страдать от или иметь заболевание, состояние, расстройство, повреждение или проблему со здоровьем, или развитие или прогрессирование таких состояний и/или симптомов таких состояний.

Что касается аутоиммунных расстройств, опосредованных IRAK4, для целей настоящего изобретения, то понятия "предупреждение", "профилактика" или "предотвращение" следует понимать как означающие поддерживающую терапию после ремиссии расстройства для предотвращения рецидива (повторения). Это означает, что новый острый воспалительный эпизод может быть предотвращен или, по крайней мере, отсрочен.

Под "ремиссией расстройства" следует понимать временное или постоянное прекращение симптомов заболевания физического или психического характера, но без достижения постоянного выздоровления.

Под "рецидивом" или "повторением" следует понимать повторное возникновение заболевания или его симптомов после лечения, которое было временно успешным, или после спонтанной ремиссии.

Лечение или предупреждение заболевания, состояния, расстройства, повреждения или проблемы со здоровьем может быть частичным или полным.

Соединения в соответствии с изобретением можно применять отдельно или, если требуется, в сочетании с другими активными ингредиентами. Настоящее изобретение также относится к лекарственным средствам, содержащим по меньшей мере одно из соединений в соответствии с изобретением один или несколько дополнительных активных ингредиентов, в особенности для лечения и/или предупреждения вышеупомянутых нарушений. Предпочтительные примеры активных ингредиентов, пригодных для комбинаций, включают:

В общем, можно упомянуть такие активные ингредиенты, как антибактериальные (например, пенициллины, ванкомицин, цiproфлоксацин, мупироцин), противовирусные (например, ацикловир, осельтамивир) и противогрибковые (например, нафтифин, нистатин) вещества, гамма-глобулины, иммуномодулирующие и иммуносупрессорные соединения, такие как циклоспорин, метотрексат®, блокаторы ФНО (например, Humira®, этанерцепт, инфликсимаб, голимумаб и цертолизумаб пегол), ингибиторы IL-1 (например, анакинра, канакинумаб, рилонацепт), ингибиторы фосфодиэстеразы (например, апремиласт), ингибиторы Jak/STAT (например, тофацитиниб, барицитиниб, GLPG0634), лефлуномид, финголимод, терифлуномид, диметилфумараты (например, текфидера), антагонисты IL-6 (актепра, сарилумаб), ингибиторы IL-2 (например, стелара), ацетат глатирамера (например, копаксон, глатопа), тизабри, циклофосфамид, ритуксимаб, белимунаб, ингибиторы кальциневрина (например, такролимус), рапамицин, микофенолат мофетила, интерфероны (например, бетаферон), кортикостероиды/глюкокортикоиды (например, преднизон, преднизолон, дексаметазон, метилпреднизолон, гидрокортизон, бетаметазон), циклофосфамид, азатиоприн и сульфасалазин; парацетамол, антигистаминные препараты (например, азеластин в Allergodil®, гидроксизин в Atarax®, клемастин в Tavegil®), нестероидные противовоспалительные вещества (НПВВ) (аспирин, ибупрофен, напроксен, этодолак, целекоксиб, колхицин).

В дополнение к упомянутому выше ингибиторы IRAK4 в соответствии с изобретением можно также комбинировать со следующими активными ингредиентами:

6-меркаптопурин, ингибиторы АПФ (например, беназеприл), ингибиторы ацетилхолинэстеразы (например, донепезил), блокаторы рецепторов ангиотензина (например, лозартан, валсартан), анионообменники (например, колестирамин, колестипол, колесевелам), антибиотики, такие как, например, цiproфлоксацин и метронидазол, анти-CD3-антитела, антихолинергические средства (например, гликопирроний), противодиабетические средства, такие как, например, метформин, противодиабетические лекарственные средства, такие как, например, лоперамид или слабительные (бисакодил), противосудорожные лекарственные средства (например, габапентин); анти-T-лимфоцитарный глобулин/антилимфоцитарный глобулин, апремиласт, азатиоприн, базиликсимаб, белимунаб, бета-2 симпатомиметики (например, сальбутамол), бета-блокаторы (например, метопролол), бета-интерферон (IFN-бета) (например, IFN бета-1b,

IFN бета-1a Avonex® и Betaferon®), биологические препараты для В-клеточной и Т-клеточной терапии (например, ритуксимаб, абатацепт), ингибиторы кальциневрина (например, такролимус), блокаторы кальциевых каналов (например, нифедипин), хлорохин, кортизон, циклофосфамид, циклоспорин, даклизумаб, дитранол, диуретики (например, гидрохлоротиазид), ингибиторы DPP-4 (дипептидилпептидазы 4) (например, линаглиптин, саксаглиптин, ситаглиптин, вильдаглиптин), эзетимиб, статины (например, симвастатин, флувастатин), фибраты (например, безафибрат, этофибрат, фенофибрат, гемфиброзил), финголимод, фумараты (диметилфумараты), глатирамер ацетат, глиниды (например, натеглинид), глюкокортикоиды, мочевины, гидроксихлорохин, антитела IgE, иммуноглобулины, иммунодепрессивные средства, такие как митоксантрон, азатиоприн и циклофосфамид, миметики инкретина (гормон глюкозозависимый инсулиноподобный пептид (GIP)- и глюкагоноподобный пептид 1 (GLP-1)-аналоги/агонисты) (например, эксенатид, лираглутид, ликсисенатид), сенситизаторы инсулина (например, пиоглитазон) и терапия инсулином (например, инсулин NPH, инсулин лизпро), интерфероны, антитела к интегринам (например, ведолизумаб, натализумаб), ингибиторы Jak/STAT (например, тофацитиниб, барицитиниб, GLPG0634), препараты, содержащие кортизол, антагонисты лейкотриеновых рецепторов (например, монтелукаст), лефлуномид, ингибиторы MAO (моноаминоксидазы) (например, селегилин), мезалазин, метотрексат, метилксантины (например, теофиллин), натализумаб, производные никотиновой кислоты (например, никотиновая кислота/ларопринант), ингибиторы PDE-4 (фосфодиэстераза типа 4) (например, рофлумиласт), фототерапия, пробиотические бактерии (Mutaflor, VSL#3®, Lactobacillus GG, Lactobacillus plantarum, L. acidophilus, L. casei, Bifidobacterium infantis 35624, Enterococcus faecium SF68, Bifidobacterium longum, Escherichia coli Nissle 1917), рапамицин, ретиноид, ритуксимаб, салициловая кислота, секукинумаб, ингибиторы SGLT2 (натрий-глюкозный котранспортер 2)/глифлозин (например, дапаглифлозин, эмпаглифлозин), статины (например, симвастатин, флувастатин), сульфасалазин, сульфаниламиды (например, глибенкламид, толбутамид), терифлуномид, тоцилизумаб, местные стероиды, устекинумаб, ведолизумаб, аналоги витамина D3, такие как, например, кальцитриол, такальцитол или кальцитриол; ингибиторы клеточного деления (например, азатиоприн, микофенолат мофетил, микофеноловая кислота, эверолимус или сиролимус) и ингибиторы α-глюкозидазы (например, акарбоза, миглитол, воглибиоза).

Следует также упомянуть лекарственные средства, содержащие по меньшей мере одно из соединений по изобретению и один или несколько других активных ингредиентов, в особенности ингибиторы EP4 (ингибиторы рецептора 4 простагландина E2), ингибиторы P2X3 (P2X пуриноцептор 3), ингибиторы PTGES (ингибиторы простагландин E синтазы), ингибиторы P2X4 (P2X пуриноцептор 4), ингибиторы MKNK1/2 (MAP киназа-взаимодействующая с серин/треонин-протеинкиназой 1/2) или ингибиторы AKR1C3 (ингибиторы альдокеторедуктазы 1-го семейства, член C3) для лечения и/или предупреждения вышеупомянутых заболеваний.

Соединения в соответствии с изобретением могут действовать системно и/или местно. Для этой цели их можно вводить пригодным способом, например пероральным, парентеральным, внутригочным, назальным, сублингвальным, лингвальным, буквальным, ректальным, дермальным, трансдермальным, конъюнктивальным путем или в ухо, или в виде имплантата или стента.

Соединения в соответствии с изобретением можно вводить в лекарственных формах, пригодных для этих путей введения.

Пригодными лекарственными формами для перорального введения являются формы, которые функционируют в соответствии с известным уровнем техники и высвобождают соединения в соответствии с изобретением быстро и/или модифицированным образом и которые содержат соединения в соответствии с изобретением в кристаллической и/или аморфной и/или растворенной форме, например таблетки (непокрытые или покрытые оболочкой таблетки, например, имеющие устойчивые к желудочному соку покрытия или покрытия, которые растворяются с задержкой, или нерастворимые покрытия, которые контролируют высвобождение соединения в соответствии с изобретением), таблетки или пленки/облатки, которые быстро распадаются в ротовой полости, пленки/лиофилизаты, капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы), таблетки с сахарным покрытием, гранулы, пеллеты, порошки, эмульсии, суспензии, аэрозоли или растворы.

Парентеральное введение можно осуществить, избегая стадии всасывания (например, внутривенным, внутриартериальным, внутрисуставным внутрисердечным, интраспинальным или интралимбальным путем) или с включением стадии всасывания (например, внутримышечным, подкожным, внутрикожным, чрескожным или внутрибрюшинным путем). Пригодные лекарственные формы для парентерального введения включают составы для инъекций и инфузий в форме растворов, суспензий, эмульсий, лиофилизатов или стерильных порошков.

Для других путей введения пригодными примерами являются ингаляционные формы лекарственных средств (включающие применение порошковых ингаляторов, небулайзеров), капли в нос, растворы или спреи, таблетки, пленки/облатки или капсулы для лингвального, сублингвального или буккального введения, суппозитории, препараты для введения в уши или в глаза, водные суспензии (лосьоны, взбалтываемые смеси), липофильные суспензии, мази, кремы, трансдермальные терапевтические системы (например, пластыри), молочко, пасты, пены, присыпки, имплантаты или стенты.

Предпочтение отдают пероральному или парентеральному введению, особенно пероральному введению.

Соединения в соответствии с изобретением могут быть преобразованы в упомянутые лекарственные формы. Это можно осуществить по сути известным способом смешивания с инертными, нетоксичными, фармацевтически пригодными наполнителями. Такие наполнители включают носители (например, микрокристаллическую целлюлозу, лактозу, маннит), растворители (например, жидкие полиэтиленгликоли), эмульгаторы и диспергирующие или смачивающие средства (например, додецилсульфат натрия, полиоксисорбитанолеат), связующие вещества (например, поливинилпирролидон), синтетические и природные полимеры (например, альбумин), стабилизаторы (например, антиоксиданты, например, аскорбиновую кислоту), красители (например, неорганические пигменты, например, оксиды железа) и добавки для коррекции вкуса и/или запаха.

Настоящее изобретение также обеспечивает лекарственные средства, которые содержат по меньшей мере одно соединение в соответствии с изобретением, как правило, вместе с одним или несколькими инертными, нетоксичными, фармацевтически приемлемыми наполнителями, и их применение для вышеуказанных целей.

В общем, было обнаружено, что в случае парентерального введения для достижения эффективных результатов выгодно вводить соединения в количестве приблизительно от 0,001 до 1 мг/кг, приблизительно от 0,01 до 0,5 мг/кг массы тела. В случае перорального введения дозировка составляет приблизительно от 0,01 до 100 мг/кг, предпочтительно приблизительно от 0,01 до 20 мг/кг и наиболее предпочтительно от 0,1 до 10 мг/кг массы тела.

Тем не менее, в некоторых случаях может оказаться необходимым отклониться от указанных количеств, а именно в зависимости от массы тела, пути введения, индивидуального ответа на активный ингредиент, природы препарата и времени введения или интервала, в течение которого его осуществляют. Таким образом, в некоторых случаях может быть достаточно количеств, меньших упомянутого выше минимального количества, в то время как в других случаях упомянутый верхний предел должен быть превышен. В случае введения более значительных количеств, может оказаться целесообразным разделить их на несколько отдельных доз, вводимых в течение суток.

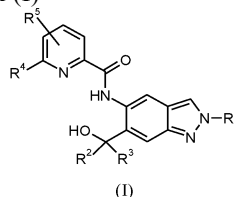
Демонстрационные примеры, которые приведены ниже, иллюстрируют изобретение. Изобретение не ограничено такими примерами.

Если не указано иное, процентные значения, упомянутые в тестах и примерах, которые приведены ниже, являются процентными значениями по массе; части являются частями по массе. Соотношения растворителей, степени разбавлений и данные концентраций для растворов жидкость/жидкость в каждом случае пересчитаны на объем.

Получение соединений в соответствии с изобретением

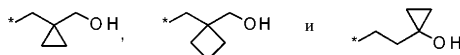
Соединения, описанные в настоящей заявке, и их получение представлены в пока неопубликованной заявке РСТ/ЕР 2015/077596.

Получение соединений общей формулы (I)



в которой

R^1 представляет собой C_1 - C_6 -алкил, где C_1 - C_6 -алкильный радикал является незамещенным или моно- или полизамещенным одинаково или по-разному посредством галогена, гидроксильной, незамещенной или моно- или полигалогензамещенной C_3 - C_6 -циклоалкильной или радикала R^6 , R^7SO_2 , R^7SO или R^8O , или группу, выбранную из



где * представляет собой место связывания группы с остальной частью молекулы;

R^2 и R^3 всегда имеют одно и то же определение и оба являются или водородом, или C_1 - C_6 -алкилом;

R^4 представляет собой галоген, циано, незамещенный или однократно или многократно одинаково или по-разному замещенный C_1 - C_6 -алкил или незамещенный или однократно или многократно одинаково или по-разному замещенный C_3 - C_6 -циклоалкил, и заместители выбраны из группы галогена и гидроксильной;

R^5 представляет собой водород, галоген или незамещенный или моно- или полигалогензамещенный C_1 - C_6 -алкил;

R^6 представляет собой незамещенный или моно- или ди-метилзамещенный моноциклический насыщенный гетероцикл с 4-6 кольцевыми атомами, который содержит гетероатом или гетерогруппу из группы O, S, SO и SO_2 ;

R^7 представляет собой C_1 - C_6 -алкил, где C_1 - C_6 -алкильный радикал является незамещенным или моно- или полизамещенным одинаково или по-разному посредством галогена, гидроксилы или C_3 - C_6 -циклоалкила,

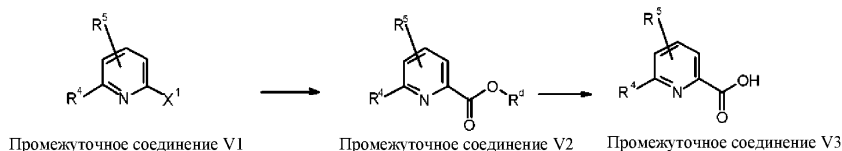
или R^7 представляет собой C_3 - C_6 -циклоалкил;

R^8 представляет собой C_1 - C_6 -алкил, где C_1 - C_6 -алкильный радикал является незамещенным или моно- или полизамещенным одинаково или по-разному посредством галогена;

показано при помощи схем синтеза, которые следуют ниже.

Исходные вещества, используемые для синтеза соединений общей формулы (I), представляют собой карбоновые кислоты (промежуточное соединение V3), которые являются коммерчески доступными или их можно получить известными из литературных источников способами или аналогично известным из литературных источников способам (см., например, European Journal of Organic Chemistry 2003, 8, 1559-1568, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1990, 38, 9, 2446-2458, Synthetic Communications 2012, 42, 658-666, Tetrahedron, 2004, 60, 51, 11869-11874) (см., например, схему синтеза 1). Некоторые карбоновые кислоты V3 могут быть получены из сложных эфиров карбоновых кислот (промежуточное соединение V2) путем гидролиза (см., например, реакцию этил 6-(гидроксиметил)пиридин-2-карбоксилата с водным раствором гидроксида натрия в метаноле, WO 200411328) или - в случае сложного трет-бутилового эфира - путем реакции с кислотой, например, хлористоводородной или трифторуксусной кислотой (см., например, Dalton Transactions, 2014, 43, 19, 7176-7190). Карбоновые кислоты V3 также можно использовать в виде их солей щелочных металлов. Промежуточные соединения V2 также необязательно можно получить из промежуточных соединений V1, которые несут атом хлора, брома или йода в качестве заместителя X по реакции в атмосфере монооксида углерода, необязательно при повышенном давлении, в присутствии фосфинового лиганда, например, 1,3-бис(дифенилфосфино)пропана, соединения палладия, например, ацетата палладия(II), и основания, например триэтиламина, с добавлением этанола или метанола в растворителе, например диметилсульфоксиде (для способов получения см., например, WO 2012112743, WO 2005082866, Chemical Communications (Cambridge, Англия), 2003, 15, 1948-1949, WO 200661715). Промежуточные соединения V1 являются или коммерчески доступными, или их можно получить известными из литературных источников способами. Иллюстративные способы получения подробно описаны в WO2012061926, European Journal of Organic Chemistry, 2002, 2, 327-330, Synthesis, 2004, 10, 1619-1624, Journal of the American Chemical Society, 2013, 135, 32, 12122-12134, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2014, 24, 16, 4039-4043, US 2007185058, WO 2009117421.

Схема синтеза 1

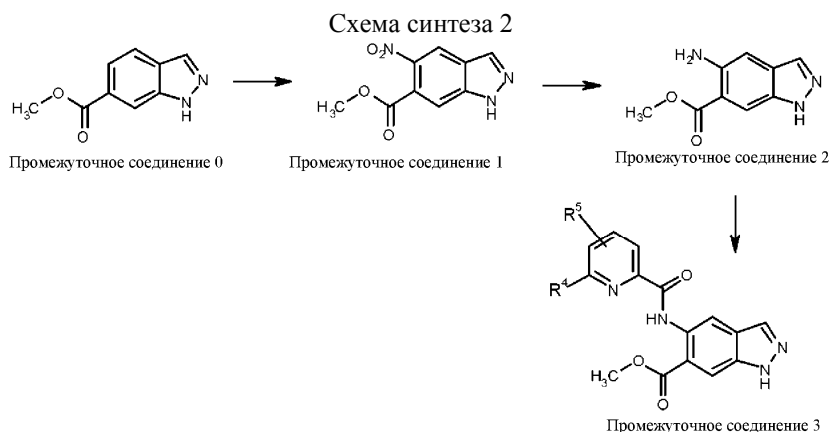


X^1 представляет собой хлор, бром или йод.

R^d представляет собой метил, этил, бензил или трет-бутил.

R^4 , R^5 , каждый, как определено в общей формуле (I).

Метил 5-амино-1H-индазол-6-карбоксилат (промежуточное соединение 2) может быть получен, исходя из метил 1H-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 0) согласно схеме синтеза 2 в соответствии со схемой синтеза 2 путем нитрирования и восстановления нитрогруппы промежуточного соединения 1 водородом в присутствии палладия на угле, аналогично WO 2008/001883. Для получения промежуточных соединений 3, исходя из промежуточного соединения 2, можно использовать различные реагенты сочетания, известные из литературных источников (Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry, том 3-Building Blocks, Catalysis and Coupling Chemistry, Andrew B. Hughes, Wiley, глава 12-Peptide-Coupling Reagents, 407-442; Chem. Soc. Rev., 2009, 38, 606). Например, можно использовать гидрохлорид 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимида в комбинации с гидратом 1-гидрокси-1H-бензотриазола (HOBt, WO 2012107475; Bioorg. Med. Chem. Lett., 2008, 18, 2093), тетрафторборатом (1H-бензотриазол-1-илокси)(диметиламино)-N,N-диметилметанаминия (TBTU, CAS 125700-67-6), гексафторфосфатом (диметиламино)-N,N-диметил(3H-[1,2,3]триазол[4,5-b]пиридин-3-илокси)метанаминия (HATU, CAS 148893-10-1), пропанфосфоновым ангидридом (в виде раствора в этилацетате или ДМФА, CAS68957-94-8) или ди-1H-имидазол-1-илметаном (CDI) в качестве реагентов сочетания, с добавлением к реакционной смеси в каждом случае основания, такого как триэтиламин или N-этил-N-изопропилпропан-2-амин. Предпочтение отдают применению TBTU и N-этил-N-изопропилпропан-2-амин в ТГФ.



Каждый из заместителей R^4 , R^5 имеет значения, определенные в общей формуле (I).

Исходя из промежуточных соединений 3, можно получить производные 2-замещенного индазола (промежуточное соединение 4) (см. схему синтеза 3). Применимые реакции для этой цели включают в себя реакции с необязательно замещенными алкилхлоридами, алкилбромидами, алкилиодидами или алкил-4-метилбензолсульфонатами. Используемые алкилгалогениды или алкил-4-метилбензолсульфонаты коммерчески доступны или могут быть получены аналогично известным из литературных источников способом (для получения алкил-4-метилбензолсульфонатов одним примером является реакция соответствующего спирта с 4-метилбензолсульфонилхлоридом в присутствии триэтиламина или пиридина; см., например, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2006, 14, 12, 4277-4294). Необязательно, в случае применения алкилхлоридов или алкилбромидов, также возможно добавлять йодид щелочного металла, такой как йодид калия или йодид натрия. Применимые основания могут представлять собой, например, карбонат калия, карбонат цезия или гидрид натрия. В случае реакционноспособных алкилгалогенидов также возможно в некоторых случаях использовать N-циклогексил-N-метилциклогексанамины. Применимые растворители включают, например, 1-метилпирролидин-2-он, ДМФА, ДМСО или ТГФ. Необязательно, используемые алкилгалогениды или алкил-4-метилбензолсульфонаты могут иметь функциональные группы, которые необязательно заранее защищены защитной группой (см. также P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, Fourth Edition, ISBN: 9780471697541). При применении, например, алкилгалогенидов или алкил-4-метилбензолсульфонатов, имеющих одну или несколько гидроксильных групп, эти гидроксильные группы могут быть необязательно защищены трет-бутил(диметил)силильной группой или подобной кремнийсодержащей защитной группой, известной специалистам в данной области. Альтернативно, гидроксильные группы также могут быть защищены тетрагидро-2Н-пирановой группой (ТНП) или ацетильной или бензоильной группой. Используемые защитные группы затем можно отщепить до синтеза промежуточного соединения 4, или так же после синтеза (I). Если, например, трет-бутил(диметилсилильная) группа используется в качестве защитной группы, то ее можно отщепить, с использованием тетрабутилфторида аммония в растворителе, таком как, например, ТГФ. ТНП защитную группу можно отщепить, например, с использованием 4-метилбензолсульфоновой кислоты (необязательно в форме моногидрата). Ацетильные группы или бензоильные группы можно отщепить обработкой водным раствором гидроксида натрия.

Используемые алкилгалогениды или алкил-4-метилбензолсульфонаты могут необязательно содержать функциональные группы, которые можно подвергнуть реакциям окисления или восстановления, известным специалистам в данной области (см., например, *Science of Synthesis*, Georg Thieme Verlag). Если, например, функциональная группа представляет собой сульфидную группу, то ее можно окислить способами, известными в литературных источниках, до сульфоксидной или сульфоновой группы. В случае сульфоксидной группы ее также можно окислить до сульфоновой группы. Для этих стадий окисления можно использовать, например, 3-хлорпербензойную кислоту (CAS 937-14-4) (в этом отношении см. также, например, US 201094000 для окисления производного 2-(метилсульфанил)этил-1Н-пиразола до производного 2-(метилсульфинил)этил-1Н-пиразола и окисления дополнительного производного 2-(метилсульфанил)этил-1Н-пиразола до производного 2-(метилсульфонил)этил-1Н-пиразола). Если используемые алкилгалогениды или тозилаты содержат кетогруппу, то ее можно восстановить с помощью способов восстановления, известных специалистам в данной области, до спиртовой группы (см., например, *Chemische Berichte*, 1980, 113, 1907-1920 для использования боргидрида натрия). Эти стадии окисления или восстановления можно впоследствии осуществить до синтеза промежуточного соединения 4, или же после синтеза соединения в соответствии с изобретением общей формулы (I). Альтернативно, промежуточное соединение 4 можно получить по реакции Мицунобу (см., например, K. C. K. Swamy и др. *Chem. Rev.* 2009, 109, 2551-2651) из промежуточного соединения 3 с необязательно замещенными алкиловыми спиртами. Можно применять различные фосфины, такие как трифенилфосфин, трибутилфосфин или 1,2-дифенилфосфиноэтан в комбинации с диизопропилазодикарбоксилатом (CAS 2446-83-5) или другими производными диазола, упомянутыми в литературных источниках (K. C. K. Swamy и др.

Chem. Rev. 2009, 109, 2551-2651). Предпочтение отдают применению трифенилфосфина и диизопропилазодикарбоксилата. Если алкиловый спирт несет функциональную группу, то возможно, как в случае вышеупомянутых реакций с алкилгалогенидами, осуществить известные приемы с защитными группами (дальнейшие указания можно найти в P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, четвертое издание, ISBN: 9780471697541) и как в случае вышеупомянутых реакций с алкилгалогенидами осуществить стадии окисления или восстановления соответственно до синтеза промежуточного соединения 4, или же после синтеза соединений в соответствии с изобретением общей формулы (I). Исходя из промежуточного соединения 4, соединения в соответствии с изобретением общей формулы (I), где R^2 и R^3 определены как C_1-C_6 -алкил (где R^2 и R^3 имеют одинаковое определение), можно получить с помощью реакции Гриньяра (см., например, реакцию производного метил-1Н-индазол-6-карбоксилата с метилмагнийбромидом в EP 2489663). Для реакции Гриньяра можно использовать галогениды алкилмагния. Особое предпочтение отдают метилмагнийхлориду или метилмагнийбромиду в ТГФ или диэтиловом эфире, или так же в смесях ТГФ и диэтилового эфира. Альтернативно, исходя из промежуточного соединения 4, соединения в соответствии с изобретением общей формулы (I), где R^2 и R^3 определены, как C_1-C_6 -алкил (где R^2 и R^3 имеют одинаковое определение), можно получить с помощью реакции с алкиллитиевым реагентом (см., например, реакцию производного метил-2-амино-4-хлор-1-метил-1Н-бензимидазол-7-карбоксилата с изопропиллитием или трет-бутиллитием в WO 2006116412). Исходя из промежуточного соединения 4, можно получить соединения в соответствии с изобретением общей формулы (I), где R^2 и R^3 определены как H, путем восстановления алюмогидридом лития в ТГФ, боргидридом лития в ТГФ или боргидридом натрия в ТГФ, необязательно с добавлением метанола, или смесями боргидрида лития и боргидрида натрия.



Каждый из заместителей R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 имеет значения, определенные в общей формуле (I).

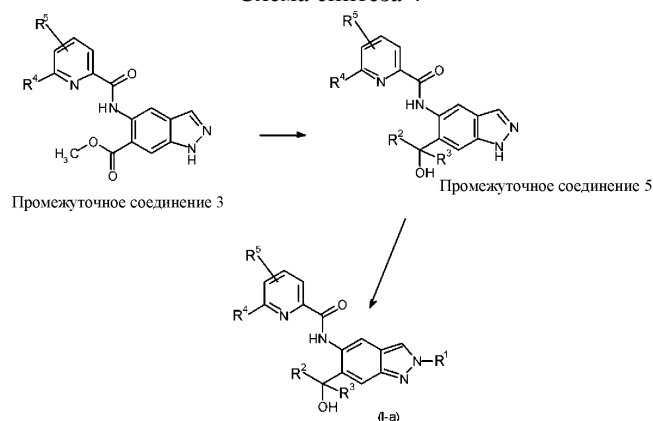
Исходя из промежуточного соединения 3, промежуточное соединение 5, где R^2 и R^3 определены как C_1-C_6 -алкил (где R^2 и R^3 имеют одинаковое определение), можно получить с помощью реакции Гриньяра (см., например, схему синтеза 4). Для этой цели можно применять пригодные галогениды алкилмагния, например метилмагнийхлорид или метилмагнийбромид в ТГФ или в диэтиловом эфире или же в смесях ТГФ и диэтилового эфира.

Исходя из промежуточного соединения 5, затем можно получить часть (I-a) соединений в соответствии с изобретением формулы (I), где R^2 и R^3 определены как C_1-C_6 -алкил (где R^2 и R^3 имеют одинаковое определение). Для этой цели аналогично схеме синтеза 3 (получение промежуточного соединения 3) применимыми являются реакции промежуточного соединения 5 с необязательно замещенными алкилхлоридами, алкилбромиды, алкилйодидами или алкил-4-метилбензолсульфонатами. Можно использовать приемы с защитными группами, аналогично описанным в схеме синтеза 3.

Альтернативно, для получения части (I-a) соединений в соответствии с изобретением формулы (I), где R^2 и R^3 определены как C_1-C_6 -алкил (где R^2 и R^3 имеют одинаковое определение), можно использовать реакцию Мицунобу промежуточного соединения 5 с необязательно замещенными алкиловыми спиртами (аналогично схеме синтеза 3).

Если R^1 в соединениях формулы (I-a) включает пригодную функциональную группу, затем необязательно возможно, по аналогии со схемой синтеза 3, использовать реакции окисления или реакции восстановления для получения дополнительных соединений в соответствии с изобретением.

Схема синтеза 4



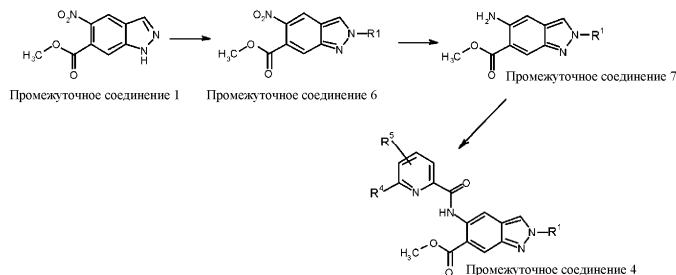
Каждый из заместителей R^1 , R^4 , R^5 имеет значения, определенные в общей формуле (I). R^2 и R^3 всегда имеют одно и то же определение и оба представляют собой C_1 - C_6 -алкил.

Исходя из промежуточного соединения 1, можно получить промежуточное соединение 4 альтернативным способом (см. схему синтеза 5). Прежде всего, промежуточное соединение 1 превращают в промежуточное соединение 6 способами, как в схеме синтеза 3 (получение промежуточного соединения 4 из промежуточного соединения 3).

Промежуточное соединение 6 затем можно превратить в промежуточное соединение 7 путем восстановления нитрогруппы. Например, нитрогруппу можно восстановить палладием на угле в атмосфере водорода (см., например, WO 2013174744 для восстановления 6-изопропокси-5-нитро-1H-индазола в 6-изопропокси-1H-индазол-5-амине) или используя железо и хлорид аммония в воде и этаноле (см., например, также Journal of the Chemical Society, 1955, 2412-2419), или используя хлорид олова(II) (CAS 7772-99-8). Предпочтительным является применение железа и хлорида аммония в воде и этаноле. Получение промежуточного соединения 4 из промежуточного соединения 7 можно осуществить аналогично схеме синтеза 2 (получение промежуточного соединения 3 из промежуточного соединения 2).

Как описано для схемы синтеза 3, необязательно можно использовать приемы с защитными группами и в случае схемы синтеза 5. Необязательно, дополнительно возможно, исходя из промежуточного соединения 6 или промежуточного соединения 7, как описано для схемы синтеза 3, провести реакции окисления или восстановления, известные специалистам в данной области (см., например, Science of Synthesis, Georg Thieme Verlag).

Схема синтеза 5



Каждый из заместителей R^1 , R^4 , R^5 имеет значения, определенные в общей формуле (I).

Синтез примерных соединений

Сокращения и пояснения

ДМФА	<i>N,N</i> -диметилформамид
ДМСО	диметилсульфоксид
ТГФ	тетрагидрофуран
RT	комнатная температура
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ч	час(ы)
НСООН	муравьиная кислота
MeCN	ацетонитрил
мин.	минута(ы)
СЭЖХ	сверхэффективная жидкостная хроматография
DAD	детектор на диодной матрице
ELSD	испарительный детектор светорассеяния
ЭРИ	электрораспылительная ионизация
SQD	одноквадрупольный детектор
CPG	прецизионное стекло с вытянутой средней частью
NH ₃	аммиак

Термин раствор хлорида натрия всегда означает насыщенный водный раствор хлорида натрия.

Химические названия промежуточных соединений и примеров генерировали с использованием программного обеспечения ACD/LABS (Batch Version 12.01.).

Методы

В некоторых случаях, соединения общей формулы (I) и их предшественники и/или промежуточные соединения анализировали при помощи

ЖХ-МС.

Метод A1: СЭЖХ (MeCN-HCOOH):

Прибор: Waters Acquity СЭЖХ-МС SQD 3001; колонка: Acquity СЭЖХ ВЕН C18 1.7 50×2.1 мм; элюент А: вода + 0.1 об.% муравьиной кислоты (99%), элюент В: ацетонитрил; градиент: 0-1.6 мин 1-99% В, 1.6-2.0 мин 99% В; скорость потока 0.8 мл/мин; температура: 60°C; объем вводимой пробы: 2 мкл; DAD скан: 210-400 нм; РС ЭРИ+, ЭРИ-, диапазон сканирования 160-1000 m/z; ELSD.

Метод A2: СЭЖХ (MeCN-NH₃):

Прибор: Waters Acquity СЭЖХ-МС SQD 3001; колонка: Acquity СЭЖХ ВЕН C18 1.7 50×2.1 мм; элюент А: вода + 0.2 об.% аммиака (32%), элюент В: ацетонитрил; градиент: 0-1.6 мин 1-99% В, 1.6-2.0 мин 99% В; скорость потока 0.8 мл/мин; температура: 60°C; объем вводимой пробы: 2 мкл; DAD скан: 210-400 нм; РС ЭРИ+, ЭРИ-, диапазон сканирования 160-1000 m/z; ELSD.

Метод A3: (ЖХ-МС)

Прибор: Agilent 1290 Infinity ЖХ; колонка: Acquity СЭЖХ ВЕН C18 1.7 50 ×2.1 мм; элюент А: вода + 0.05 объемн.% муравьиной кислоты, элюент В: ацетонитрил + 0.05 об.% муравьиной кислоты; градиент: 0-1.7 мин 2-90% В, 1.7-2.0 мин 90% В; скорость потока 1.2 мл/мин; температура: 60°C; объем вводимой пробы: 2 мкл; DAD скан: 190-390 нм; МС: Agilent TOF 6230.

Метод A4: (ЖХ-МС)

Прибор: Waters Acquity; колонка: Kinetex (Phenomenex), 50×2 мм; элюент А: вода + 0.05 об.% муравьиной кислоты, элюент В: ацетонитрил + 0.05 об.% муравьиной кислоты; градиент: 0-1.9 мин 1-99% В, 1.9-2.1 мин 99% В; скорость потока 1.5 мл/мин; температура: 60°C; объем вводимой пробы: 0.5 мкл; DAD скан: 200-400 нм.

В некоторых случаях соединения общей формулы (I) и их предшественники и/или промежуточные соединения очищали следующими иллюстративными препаративными способами ВЭЖХ:

Способ P1: система: Waters Autopurification system: Pump 2545, Sample Manager 2767, CFO, DAD 2996, ELSD 2424, SQD; колонка: XBridge C18 5 мкм 100×30 мм; элюент А: вода + 0.1 об.% муравьиной кислоты, элюент В: ацетонитрил; градиент: 0-8 мин 10-100% В, 8-10 мин 100% В; поток: 50 мл/мин; температура: комнатная температура; раствор: макс. 250 мг/макс. 2,5 мл ДМСО или DMF; объем вводимой пробы: 1×2.5 мл; детектирование: DAD диапазон сканирования 210-400 нм; РС ЭРИ+, ЭРИ-, диапазон сканирования 160-1000 m/z.

Способ P2: система: Waters Autopurification system: Pump 254, Sample Manager 2767, CFO, DAD 2996, ELSD 2424, SQD 3100; колонка: XBridge C18 5 мкм 10×30 мм; элюент А: вода + 0.2 об.% аммиака (32%), элюент В: метанол; градиент: 0-8 мин 30-70% В; поток: 50 мл/мин; температура: комнатная температура; детектирование: DAD диапазон сканирования 210-400 нм; РС ЭРИ+, ЭРИ-, диапазон сканирования 160-1000 m/z; ELSD.

Способ P3: система: Labomatic, насос: HD-5000, отборник фракций: LABOCOL Vario-4000, УФ-детектор: Knauer UVD 2.1S; колонка: XBridge C18 5 мкм 100×30 мм; элюент А: вода + 0.2 об.% аммиака (25%), элюент В: ацетонитрил; градиент: 0-1 мин 15% В, 1-6.3 мин 15-55% В, 6.3-6.4 мин 55-100% В, 6.4-7.4 мин 100% В; поток: 60 мл/мин; температура: комнатная температура; раствор: макс. 250 мг/2 мл ДМСО; объем вводимой пробы: 2×2 мл; детектирование: УФ 218 нм; программное обеспечение: SCPA PrepCon5.

Способ P4: система: Labomatic, насос: HD-5000, отборник фракций: LABOCOL Vario-4000, УФ-детектор: Knauer UVD 2.1S; колонка: Chromatorex RP C18 10 мкм 125×30 мм; элюент А: вода + 0.1 об.% муравьиной кислоты, элюент В: ацетонитрил; градиент: 0-15 мин 65-100% В; поток: 60 мл/мин; температура: комнатная температура; раствор: макс. 250 мг/2 мл ДМСО; объем вводимой пробы: 2×2 мл; детектирование: УФ 254 нм; программное обеспечение: SCPA PrepCon5.

Способ P5: система: Sepiatec: Преп. SFC100, колонка: Chiralpak IA 5 мкм 250×20 мм; элюент А: двуокись углерода, элюент В: этанол; градиент: изократический 20% В; поток: 80 мл/мин; температура: 40°C; раствор: макс. 250 мг/2 мл ДМСО; объем вводимой пробы: 5×0.4 мл; детектирование: УФ 254 нм.

Способ P6: система: Agilent: Преп.1200, 2 х преп. насос, DLA, MWD, Gilson: Liquid Handler 215; колонка: Chiralcel OJ-H 5 мкм 250×20 мм; элюент А: гексан, элюент В: этанол; градиент: изократический 30% В; поток: 25 мл/мин; температура: 25°C; раствор: 187 мг/8 мл этанол/метанол; объем вводимой пробы: 8×1.0 мл; детектирование: УФ 280 нм.

Способ P7: система: Labomatic, насос: HD-5000, отборник фракций: LABOCOL Vario-4000, УФ-детектор: Knauer UVD 2.1S; колонка: XBridge C18 5 мкм 100×30 мм; элюент А: вода + 0.1 об.% муравьиной кислоты, элюент В: ацетонитрил; градиент: 0-3 мин: 65% В изократический, 3-13 мин: 65-100% В;

поток: 60 мл/мин; температура: комнатная температура; раствор: макс. 250 мг/2 мл ДМСО; объем вводимой пробы: 2×2 мл; детектирование: УФ 254 нм.

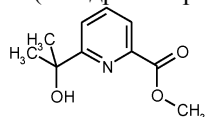
Способ Р8: система: Agilent: Преп.1200, 2 х преп. насос, DLA, MWD, Gilson: Liquid Handler 215; колонка: Chiralpak IF 5 мкм 250×20 мм; элюент А: этанол, элюент В: метанол; градиент: изократический 50% В; поток: 25 мл/мин; температура: 25°C; раствор: 600 мг/7 мл N,N-диметилформамид; объем вводимой пробы: 10×0.7 мл; детектирование: УФ 254 нм.

В некоторых случаях, смеси веществ очищали колоночной хроматографией на силикагеле.

Для получения некоторых соединений общей формулы (I) и их предшественников и/или промежуточных соединений очистку с помощью колоночной хроматографии ("флеш-хроматографии") проводили на силикагеле с использованием устройств Isolera" от Biotage. Это осуществляли с использованием картриджей от Biotage, например, картриджа "SNAP Cartridge, KPSIL" разного размера и картриджей "Interchim Puriflash Silica HP 15UM flash column" от Interchim разного размера.

Исходные вещества

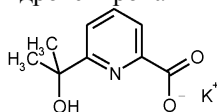
Промежуточное соединение V2-1. Метил 6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-2-карбоксилат



2.00 г (9.26 ммоль) 2-(6-бромпиридин-2-ил)пропан-2-ола (CAS 638218-78-7) растворяли в 20 мл метанола и 20 мл ДМСО. Затем добавляли 250 мг 1,3-бис(фенилфосфино)пропана, 130 мг ацетата палладия(II) и 3 мл триэтиламина. Реакционную смесь три раза продували окисью углерода при комнатной температуре и перемешивали под 13 бар атмосферы окиси углерода в течение 30 мин. Атмосферу окиси углерода удаляли путем применения вакуума и смесь перемешивали под 14 бар атмосферы окиси углерода при 100°C в течение 24 ч. Автоклав декомпрессировали, к реакционной смеси добавляли воду, и реакционную смесь экстрагировали три раза этилацетатом, промывали насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия и раствором хлорида натрия, фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Это обеспечило 1,60 г сырого продукта.

СЭЖХ-МС (Метод А1): $V_u=0.76$ мин (УФ-детектор: ТИС), обнаруженная масса 195.00.

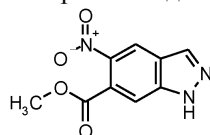
Промежуточное соединение V3-1. 6-(2-Гидроксипропан-2-ил)пиридин-2-карбоксилат калия



1,60 г сырого продукта промежуточного соединения 0-1 сначала загружали в 15 мл метанола, 0.74 г гидроксида калия добавляли и смесь перемешивали при 50°C в течение 16,5 ч. После концентрирования это обеспечило 2,1 г остатка, который использовали без дополнительной очистки.

СЭЖХ-МС (Метод А1): $V_u=0.47$ мин (УФ-детектор: ТИС), обнаруженная масса 181.00.

Промежуточное соединение 1-1. Метил 5-нитро-1Н-индазол-6-карбоксилат



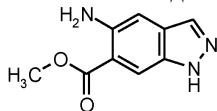
4.60 г (26.1 ммоль) метил 1Н-индазол-6-карбоксилата (CAS №: 170487-40-8) растворяли в 120 мл серной кислоты (96%) и охлаждали до -15°C в трехгорлой колбе, содержащей СРГ-мешалку, капельную воронку и внутренний термометр. В течение 15 мин нитрирующую кислоту (10 мл 96% серной кислоты в 5 мл 65% азотной кислоты), которую предварительно получали и охлаждали, добавляли по каплям к этому раствору. По окончании добавления по каплям смесь перемешивали в течение еще 1 ч (внутренняя температура при -13°C). Реакционную смесь добавляли ко льду и осадок отфильтровывали путем отсасывания, промывали водой и сушили в сушильном шкафу при температуре 50°C под сниженным давлением. Получали 5,49 г указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А2): $V_u=0.75$ мин

МС (ЭРИпоз): $m/z=222(M+H)^+$

^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ [част. на млн.]=3.87 (s, 3H), 7.96 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 13.98 (br. s., 1H).

Промежуточное соединение 2-1. Метил 5-амино-1Н-индазол-6-карбоксилат

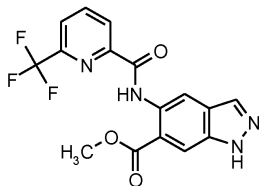


4,40 г (19.8 ммоль) метил 5-нитро-1Н-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 1-1) растворяли в 236 мл метанола и гидрировали с 1,06 г (0,99 ммоль) палладия на активированном угле под стандартным давлением водорода при 25°C в течение 3 ч. Реакционную смесь фильтровали через целит,

фильтр промывали метанолом и фильтрат концентрировали. Получали 3,53 г указанного в заголовке соединения.

^1H ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6): δ [част. на млн]=3.85 (s, 3H), 6.01 (s, 2H), 6.98 (s, 1H), 7.79-7.91 (m, 1H), 7.99 (s, 1H), 12.84 (br. s., 1H).

Промежуточное соединение 3-1. Метил 5-({[6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-1H-индазол-6-карбоксилат



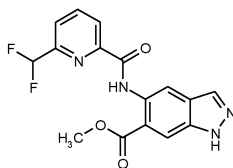
4,95 г (25.9 ммоль) 6-(трифторметил)пиридин-2-карбоновой кислоты сначала загружали в 45 мл ТГФ. Добавляли 9.07 г (28.2 ммоль) тетрафторбората О-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуриония и 4.92 мл (28.2 ммоль) N-этил-N-изопропилпропан-2-амин и смесь перемешивали при 25°C в течение 30 мин. Затем добавляли 4.50 г (23.5 ммоль) метил 5-амино-1H-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 2-1) и смесь перемешивали при 25°C в течение 24 ч. Реакционную смесь фильтровали путем отсасывания через мембранный фильтр, твердые вещества промывали посредством ТГФ и водой, и сушили в сушильном шкафу в течение ночи. Получали 7,60 г указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А2): V_R =1.16 мин

МС (ЭРИпоз): m/z =365 ($M+H$)⁺

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ [част. на млн]=3.97 (s, 3H), 8.13-8.27 (m, 2H), 8.30 (s, 1H), 8.33-8.45 (m, 1H), 8.45-8.51 (m, 1H), 9.15 (s, 1H), 12.57 (s, 1H), 13.44 (s, 1H).

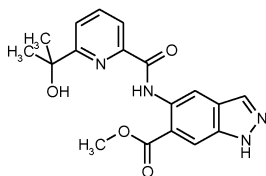
Промежуточное соединение 3-2. Метил 5-({[6-(дифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-1H-индазол-6-карбоксилат



2,85 г (23.5 ммоль) 6-(дифторметил)пиридин-2-карбоновой кислоты сначала загружали в 30 мл ТГФ. Добавляли 6.05 г (18.8 ммоль) тетрафторбората О-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуриония и 3,3 мл N-этил-N-изопропилпропан-2-амин и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем добавляли 3.00 г (15.7 ммоль) метил 5-амино-1H-индазол-6-карбоксилата и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. К реакционной смеси подмешивали воду и осадок отфильтровывали путем отсасывания и многократно промывали водой и дихлорметаном. Это обеспечило 1.53 г (27% от теории) указанного в заголовке соединения. Фазы фильтрата разделяли, органическую фазу концентрировали, подмешивали небольшое количество дихлорметана и суспендировали в ультразвуковой бане, и осадок отфильтровывали путем отсасывания. Это обеспечило еще 1.03 г указанного в заголовке соединения.

^1H ЯМР (фракция первого продукта, 300 МГц, DMSO-d_6): δ [част. на млн]=3.99 (s, 3H), 7.09 (t, 1H), 8.00 (d, 1H), 8.21-8.40 (m, 4H), 9.14 (s, 1H), 12.53 (s, 1H), 13.44 (s, 1H).

Промежуточное соединение 3-3. Метил 5-({[6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-1H-индазол-6-карбоксилат

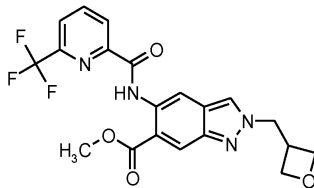


2,10 г 6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-2-карбоксилата калия (промежуточное соединение V3-1) сначала загружали в 15 мл ТГФ. Добавляли 3.69 г (11.5 ммоль) тетрафторбората О-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуриония и 2.00 мл N-этил-N-изопропилпропан-2-амин, и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем добавляли 1.83 г (9.58 ммоль) метил 5-амино-1H-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 2-1) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 19 ч. К смеси подмешивали воду и этилацетат, нерастворенные твердые вещества отфильтровывали, фазы фильтрата разделяли и водную фазу экстрагировали дважды этилацетатом, промывали раствором хлорида натрия, фильтровали через гидрофобный фильтр, концентрировали и очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат). После удаления растворителей получали 1.56 г указанного в заголовке соединения в виде желтой пены.

СЭЖХ-МС (Метод А1): V_R =1.00 мин (УФ-детектор: TIC Smooth), обнаруженная масса 354.00.

^1H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ [част. на млн]=1.63 (s, 6H), 3.97 (s, 3H), 5.37 (s, 1H), 7.90-7.95 (m, 1H), 8.03-8.07 (m, 2H), 8.23 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 12.79 (s, 1H), 13.41 (br.s., 1H).

Промежуточное соединение 4-1. Метил 2-(оксетан-3-илметил)-5-({[6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-2H-индазол-6-карбоксилат



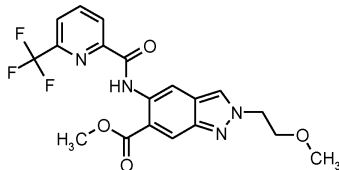
1.00 г (2.66 ммоль) метил 5-({[6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-1H-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 3-1) растворяли в 10 мл ДМФА и после добавления 1.10 г (7.99 ммоль) карбоната калия и 221 мг (1.33 ммоль) йодида калия, смесь перемешивали при 25°C в течение 30 мин. Добавляли 603 мг (3.99 ммоль) 3-бромметилоксетана и смесь перемешивали при 25°C в течение 24 ч. Реакционную смесь распределяли между водой и этилацетатом. Смесь экстрагировали дважды этилацетатом, и объединенные органические фазы фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат). Получали 260 мг указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А2): V_R =1.24 мин

МС (ЭРИпоз): m/z =435 ($M+H$) $^+$

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ [част. на млн]=3.49-3.64 (m, 1H), 3.95 (s, 3H), 4.49 (t, 2H), 4.68 (dd, 2H), 4.81 (d, 2H), 8.20 (dd, 1H), 8.35-8.41 (m, 1H), 8.43-8.49 (m, 2H), 8.55-8.58 (m, 1H), 9.06 (s, 1H), 12.53 (s, 1H).

Промежуточное соединение 4-2. Метил 2-(2-метоксиэтил)-5-({[6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-2H-индазол-6-карбоксилат



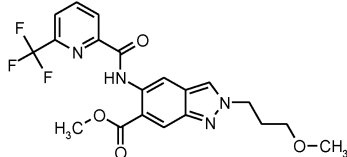
1.00 г (2.75 ммоль) метил 5-({[6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-1H-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 3-1) растворяли в 5 мл ДМФА и при перемешивании добавляли 387 мкл (4.12 ммоль) простого 2-бромэтилметилового эфира, 1.14 г (8.23 ммоль) карбоната калия и 228 мг (1.37 ммоль) йодида калия. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 24 ч, разбавляли с водой и экстрагировали два раза этилацетатом. Объединенные органические фазы фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат). Получали 12 мг указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А1): V_R =1.24 мин

МС (ЭРИпоз): m/z =423 ($M+H$) $^+$

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ [част. на млн]=3.24 (s, 3H), 3.86 (t, 2H), 3.96 (s, 3H), 4.65 (t, 2H), 8.21 (dd, 1H), 8.35-8.42 (m, 1H), 8.43-8.51 (m, 2H), 8.52 (d, 1H), 9.06 (s, 1H), 12.53 (s, 1H).

Промежуточное соединение 4-3. Метил 2-(3-метоксипропил)-5-({[6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-2H-индазол-6-карбоксилат



1.00 г (2.75 ммоль) метил 5-({[6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-1H-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 3-1) растворяли в 5 мл ДМФА и при перемешивании добавляли 460 мкл (4.12 ммоль) 1-бром-3-метоксипропана, 1.14 г (8.23 ммоль) карбоната калия и 228 мг (1.37 ммоль) йодида калия. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 72 ч, разбавляли с водой и экстрагировали два раза этилацетатом. Объединенные органические фазы фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат). Получали 28 мг указанного в заголовке соединения.

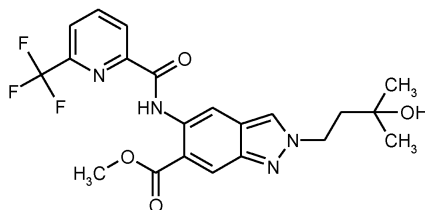
СЭЖХ-МС (Метод А1): V_R =1.29 мин

МС (ЭРИпоз): m/z =437 ($M+H$) $^+$

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ [част. на млн]=2.17 (quin, 2H), 3.24 (s, 3H), 3.33-3.36 (m, 2H), 3.96 (s, 3H), 4.53 (t, 2H), 8.21 (dd, 1H), 8.35-8.42 (m, 1H), 8.45-8.49 (m, 2H), 8.54 (d, 1H), 9.06 (s, 1H), 12.54 (s, 1H).

Промежуточное соединение 4-4. Метил 2-(3-гидрокси-3-метилбутил)-5-({[6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-2Н-индазол-6-карбоксилат

Способ получения 1:



930 мг (2.55 ммоль) метил 5-({[6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-1Н-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 3-1), 1.06 г карбоната калия и 212 мг йодида калия сначала загружали в 9 мл ДМФА и смесь перемешивали в течение 15 мин. Затем добавляли 0.62 мл 4-бром-2-метилбутан-2-ола и смесь перемешивали при 60°C в течение 16 ч. К смеси подмешивали воду и экстрагировали два раза этилацетатом, и экстракт промывали три раза насыщенным раствором хлорида натрия, фильтровали и концентрировали. Очистка с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (гексан/этилацетат) обеспечивала 424 мг указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А2): V_R =1.21 мин (УФ-детектор: ТІС), обнаруженная масса 450.00.

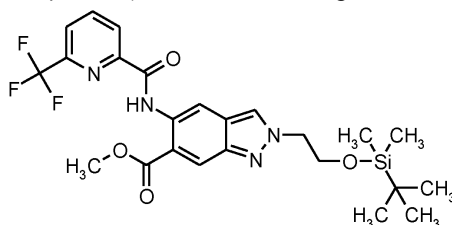
^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ [част. на млн]=1.16 (s, 6H) 2.02-2.11 (m, 2H) 3.96 (s, 3H), 4.51-4.60 (m, 3H), 8.20 (dd, J =7.83, 1.01 Гц, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.45 (s, 2H) 8.55 (d, J =0.76 Гц, 1H), 9.05 (s, 1H), 12.52 (s, 1H).

Способ получения 2:

1.95 г (7.03 ммоль) метил 5-амино-2-(3-гидрокси-3-метилбутил)-2Н-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 7-1) сначала загружали в 30 мл ТГФ. Добавляли 1.48 г (7.73 ммоль) 6-(трифторметил)пиридин-2-карбоновой кислоты, 2.71 г (8.44 ммоль) тетрафторбората О-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония и 1.47 мл (8.44 ммоль) N-этил-N-изопропилпропан-2-амин и смесь перемешивали при 25°C в течение 20,5 ч. Добавляли воду, смесь экстрагировали три раза этилацетатом и экстракты промывали раствором хлорида натрия, фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Остаток разделяли колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат градиент). Получали 2.79 г указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А1): V_R =1.23 мин (УФ-детектор: ТІС), обнаруженная масса 450.00.

Промежуточное соединение 4-5. Метил 2-(2-{трет-бутил(диметил)силил}окси)этил)-5-({[6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-2Н-индазол-6-карбоксилат



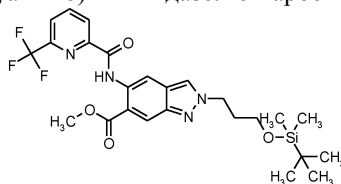
1.00 г (2.66 ммоль, 97%) метил 5-({[6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-1Н-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 3-1) сначала загружали в 50 мл ДМФА, при перемешивании добавляли 1.10 г (7.99 ммоль) карбоната калия и 221 мг (1.33 ммоль) йодида калия, и смесь перемешивали при 25°C в течение 30 мин. Затем добавляли 857 мкл (3.99 ммоль) (2-бромэтокси)трет-бутилдиметилсилана, и смесь перемешивали при 25°C в течение 24 ч. Реакционную смесь разбавляли с водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические фазы фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат). Получали 400 мг указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А1): V_R =1.58 мин

МС (ЭРІпоз): m/z =523($M+H$) $^+$

^1H ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6): δ [част. на млн.]=-0.18 - -0.13 (m, 6H), 0.74 (s, 9H), 3.96 (s, 3H), 4.08 (t, 2H), 4.57 (t, 2H), 8.15-8.25 (m, 1H), 8.32-8.43 (m, 1H), 8.43-8.52 (m, 3H), 9.07 (s, 1H), 12.53 (s, 1H).

Промежуточное соединение 4-6. Метил 2-(3-{трет-бутил(диметил)силил}окси)пропил)-5-({[6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-2Н-индазол-6-карбоксилат



Аналогично промежуточному соединению 4-5, 1.00 г (2.75 ммоль) метил 5-({[6-

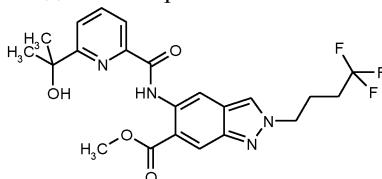
(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-1H-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 3-1) растворяли в 10 мл ДМФА, 1.14 г (8.24 ммоль) карбоната калия и добавляли 228 мг (1.37 ммоль) йодида калия при перемешивании, и смесь перемешивали при 25°C в течение 30 мин. Затем добавляли 1.04 г (4.12 ммоль) (3-бромпропокси)(трет-бутил)диметилсилана и смесь перемешивали при 25°C в течение 24 ч. Реакционную смесь фильтровали, и осадок на фильтре промывали этилацетатом. Реакционную смесь распределяли между водой и этилацетатом, и водную фазу экстрагировали дважды этилацетатом. Объединенные органические фазы фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Очистка остатка при помощи препаративной ВЭЖХ обеспечивала 428 мг указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А1): $V_u=1.63$ мин

МС (ЭРИпоз): $m/z=537(M+H)^+$

1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$): δ [част. на млн]= -0.02-0.06 (m, 6H), 0.87 (s, 9H), 2.14 (quin, 2H), 3.62 (t, 2H), 3.96 (s, 3H), 4.54 (t, 2H), 8.20 (d, 1H), 8.35-8.42 (m, 1H), 8.43-8.48 (m, 3H), 8.49-8.53 (m, 1H), 9.06 (s, 1H).

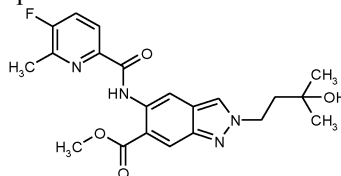
Промежуточное соединение 4-7. Метил 5-({[6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-2-(4,4,4-трифторбутил)-2H-индазол-6-карбоксилат



300 мг (0.80 ммоль) метил 5-({[6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-1H-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 3-3) сначала загружали в 4.5 мл ДМФА. Добавляли 287 мг (1.21 ммоль) 1,1,1-трифтор-4-йодбутана и 333 мг карбоната калия и смесь перемешивали при 100°C в течение 23 ч. Добавляли воду и смесь экстрагировали три раза этилацетатом. Смесь концентрировали, продукт очищали при помощи препаративной ВЭЖХ. Это обеспечило 72 мг указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А1): $V_u=1.26$ мин (УФ-детектор: ТІС), обнаруженная масса 464.17.

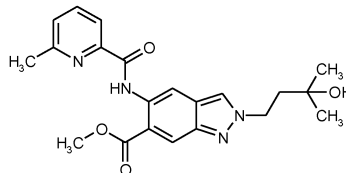
Промежуточное соединение 4-8. Метил 5-{{[5-фтор-6-метилпиридин-2-ил]карбонил}амино}-2-(3-гидрокси-3-метилбутил)-2H-индазол-6-карбоксилат



195 мг (0.46 ммоль) метил 5-амино-2-(3-гидрокси-3-метилбутил)-2H-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 7-1) вводили в реакцию с 78 мг (0.50 ммоль) 5-фтор-6-метилпиридин-2-карбоновой кислоты аналогично промежуточному соединению 4-4 (способ получения 2) в течение 19,5 ч. Получали 228 мг сырого продукта после аналогичной водной обработки.

СЭЖХ-МС (Метод А1): $V_u=1.20$ мин (УФ детектор: ТІС), обнаруженная масса 414.00.

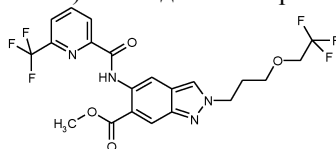
Промежуточное соединение 4-9. Метил 2-(3-гидрокси-3-метилбутил)-5-{{[6-метилпиридин-2-ил]карбонил}амино}-2H-индазол-6-карбоксилат



195 мг (0.45 ммоль) метил 5-амино-2-(3-гидрокси-3-метилбутил)-2H-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 7-1) вводили в реакцию с 70 мг (0.50 ммоль) 6-метилпиридин-2-карбоновой кислоты аналогично с получением промежуточного соединения 4-4 (способ получения 2) в течение 19,5 ч. Получали 278 мг указанного в заголовке соединения в виде сырого продукта после аналогичной водной обработки.

СЭЖХ-МС (Метод А1): $V_u=1.14$ мин (УФ-детектор: ТІС), обнаруженная масса 396.00.

Промежуточное соединение 4-10. Метил 2-[3-(2,2,2-трифторэтокси)пропил]-5-({[6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-2H-индазол-6-карбоксилат

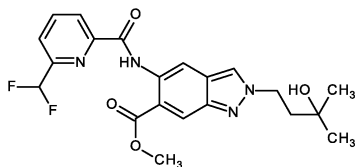


Смесь из 250 мг (0.58 ммоль) метил 5-({[6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-1Н-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 3-1), 193 мг (0.88 ммоль) 3-бромпропил 2,2,2-трифторэтилового эфира, 242 мг карбоната калия и 145 мг йодида калия в 3 мл ДМФА перемешивали при 100°C в течение 20 ч. Добавляли воду, смесь экстрагировали этилацетатом и экстракт промывали раствором хлорида натрия и концентрировали. Очистка при помощи препаративной ВЭЖХ обеспечивала 52 мг указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А1): V_R =1,39 мин (УФ-детектор: Т1С), обнаруженная масса 504,12.

Промежуточное соединение 4-11.

Метил 5-({[6-(дифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-2-(3-гидрокси-3-метилбутил)-2Н-индазол-6-карбоксилат

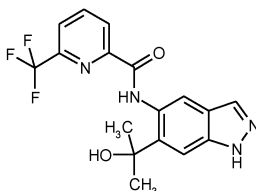


2.00 г Метил 5-амино-2-(3-гидрокси-3-метилбутил)-2Н-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 7-1) сначала загружали в 40 мл ТГФ. Добавляли 1.50 г 6-(дифторметил)пиридин-2-карбоновой кислоты, 2.78 г тетрафторбората О-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония (ТВТУ, Номер CAS 125700-67-6) и 1.5 мл N-этил-N-изопропилпропан-2-амин и смесь перемешивали при КТ в течение 24 ч. Добавляли воду, смесь экстрагировали три раза этилацетатом и объединенные органические фазы промывали раствором хлорида натрия и фильтровали через гидрофобный фильтр. Смесь концентрировали и остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат). Это обеспечило 3.05 г указанного в заголовке соединения в виде желтого твердого вещества.

СЭЖХ-МС (Метод А1): V_R =1.15 мин (УФ-детектор Т1С), обнаруженная масса 432.00.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ [част. на млн]=1.17 (s, 6H), 2.04-2.11 (m, 2H), 3.99 (s, 3H), 4.52-4.60 (m, 3H), 7.10 (t, 1H), 8.00 (dd, 1H), 8.28-8.38 (m, 2H), 8.44-8.47 (m, 1H), 8.56 (d, 1H), 9.05 (s, 1H), 12.49 (s, 1H).

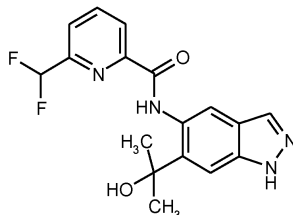
Промежуточное соединение 5-1. N-[6-(2-Гидроксипропан-2-ил)-1Н-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамид



К раствору, охлажденному в охлаждающей бане с ледяной водой, 1.50 г (4.12 ммоль) метил 5-({[6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-1Н-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 3-1) в 20 мл ТГФ осторожно добавляли 6.9 мл (5 экв.) 3М раствора бромида метилмагния в диэтиловом эфире. Смесь перемешивали при охлаждении на ледяной бане в течение 1 ч. и при комнатной температуре в течение 19,5 ч. Добавляли еще 2 экв. раствора бромида метилмагния и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение еще 24 ч. Добавляли насыщенный водный раствор хлорида аммония и смесь перемешивали и три раза экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические фазы промывали раствором хлорида натрия, фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат). Получали 763 мг указанного в заголовке соединения.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ [част. на млн]=1.63 (s, 6H), 5.99 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 8.14-8.19 (m, 1H), 8.37 (t, 1H), 8.46 (d, 1H), 8.78 (s, 1H), 12.32 (s, 1H), 12.97 (s, 1H).

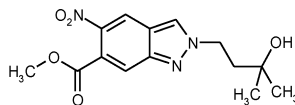
Промежуточное соединение 5-2. 6-(Дифторметил)-N-[6-(2-гидроксипропан-2-ил)-1Н-индазол-5-ил]пиридин-2-карбоксамид



Аналогично получению промежуточного соединения 5-1, 2.40 г (6.93 ммоль) метил 5-({[6-(дифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-1Н-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 3-2) в 10 мл ТГФ вводили в реакцию с тремя частями 3М раствора бромида метилмагния в диэтиловом эфире (6.9 мл, затем перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин; 11.6 мл, затем перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч; 6.9 мл, затем перемешивали при комнатной темпе-

ратуре в течение 2 ч). После обработки, как для промежуточного соединения 5-1, получали 2.39 г сырого продукта, которые использовали далее без дальнейшей очистки.

Промежуточное соединение 6-1. Метил 2-(3-гидрокси-3-метилбутил)-5-нитро-2Н-индазол-6-карбоксилат

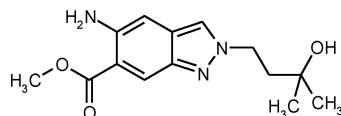


5.00 г (22.6 ммоль) метил 5-нитро-1Н-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 1-1) сначала загружали в 40 мл ДМФА. Добавляли 5.65 г (33.9 ммоль) 4-бром-2-метилбутан-2-ола, 9.37 г (67.8 ммоль) карбоната калия и 5.63 г (33.9 ммоль) йодида калия, и смесь перемешивали при 100°C в течение 20 ч. Добавляли воду, смесь экстрагировали три раза этилацетатом и экстракты промывали раствором хлорида натрия, фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат). Полученные твердые вещества экстрагировали перемешиванием с диэтиловым эфиром, отфильтровывали путем отсасывания, промывали диэтиловым эфиром и сушили. Получали 2,49 г указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А1): V_R =0.93 мин (УФ-детектор: Т1С), обнаруженная масса 307.00.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ [част. на млн]=1.15 (s, 6H), 2.02-2.11 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 4.54 (s, 1H), 4.58-4.65 (m, 2H), 8.05 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.86 (s, 1H).

Промежуточное соединение 7-1. Метил 5-амино-2-(3-гидрокси-3-метилбутил)-2Н-индазол-6-карбоксилат



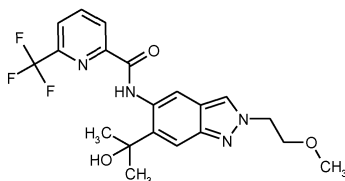
4.53 г железа и 217 мг хлорида аммония добавляли к 2.49 г (8.10 ммоль) метил 2-(3-гидрокси-3-метилбутил)-5-нитро-2Н-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 6-1) в 30 мл этанола и 10 мл воды и смесь перемешивали при 90°C в течение 21,5 ч. Смесь фильтровали через целит и три раза промывали этанолом, и фильтрат концентрировали, а к остатку подмешивали воду. Экстракцию осуществляли три раза этилацетатом (добавляли раствор хлорида натрия для улучшения разделения фаз). Объединенные органические фазы промывали раствором хлорида натрия, фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Это обеспечило 1,95 г (85% от теории) указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А1): V_R =0.67 мин (УФ-детектор: Т1С), обнаруженная масса 277.00.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ [част. на млн]=1.14 (s, 6H), 1.96-2.08 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 4.39-4.51 (m, 3H), 5.81 (s, 2H), 6.80 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 8.18 (s, 1H).

Демонстрационные примеры

Пример 1. N-[6-(2-Гидроксипропан-2-ил)-2-(2-метоксиэтил)-2Н-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамид



75 мг (0.18 ммоль) метил 2-(2-метоксиэтил)-5-([6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил)амино)-2Н-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 4-2) растворяли в 500 мкл ТГФ и смешивали с 887 мкл (0.89 ммоль) 1М раствора бромида метилмагния в ТГФ. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 60 мин. Затем осторожно добавляли 1 мл насыщенного водного раствора хлорида аммония и смесь фильтровали. Водную фазу экстрагировали дважды этилацетатом и органические фазы объединяли, фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Остаток растворяли в 3 мл ДМСО и очищали при помощи препаративной ВЭЖХ. Содержащие продукт фракции подвергали лиофилизации. Получали 20 мг указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А1): V_R =1.08 мин

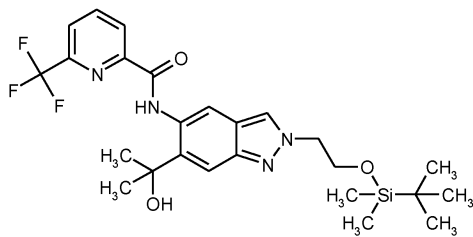
МС (ЭРИпоз): m/z =423 ($M+H$)⁺

^1H ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6): δ [част. на млн]=1.62 (s, 6H), 3.22 (s, 3H), 3.82 (t, 2H), 4.55 (t, 2H), 5.96 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 8.16 (d, 1H), 8.29-8.42 (m, 2H), 8.42-8.50 (m, 1H), 8.71 (s, 1H), 12.36 (s, 1H).

Пример 2. N-[6-(Гидроксиметил)-2-(2-метоксиэтил)-2Н-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамид

COCCCN1C=NC2=C(C1)C=C(C(C)(C)O)C(=O)N2C3=CC=CC=C3C(F)(F)FCOCCCN1C=NC2=C(C=C1)C(=C(C=C2)C(=O)Nc3cc(C(F)(F)F)ccn3)CO

- 24 -



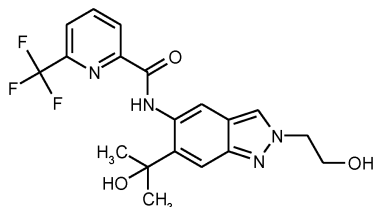
100 мг (0.19 ммоль) метил 2-(2-{[трет-бутил(диметил)силил]окси}этил)-5-({[6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-2Н-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 4-5) растворяли в 1 мл ТГФ и смешивали с 669 мкл (0.67 ммоль) 1 М раствора бромида метилмагния в ТГФ. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 60 мин. Добавляли еще 287 мкл (0.29 ммоль) 1 М раствора бромида метилмагния в ТГФ и смесь перемешивали при 25°C в течение 3 ч. Затем осторожно добавляли 20 мл насыщенного раствора хлорида аммония и смесь фильтровали. Водную фазу экстрагировали дважды этилацетатом, и органические фазы объединяли, сушили над сульфатом магния, фильтровали, концентрировали и сушили под сниженным давлением. Это обеспечило 50 мг N-[2-(2-{[трет-бутил(диметил)силил]окси}этил)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2Н-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида.

СЭЖХ-МС (Метод А2): $V_u=1.51$ мин

МС (ЭРИпоз): $m/z=523(M+H)^+$

^1H ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6): δ [част. на млн]= -0.17 - -0.09 (m, 6H), 0.78 (s, 9H), 1.62 (s, 6H), 4.04 (t, 2H), 4.47 (t, 2H), 5.98 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 8.16 (d, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.37 (t, 1H), 8.45 (d, 1H), 8.73 (s, 1H), 12.38 (s, 1H).

Стадия В:



50 мг (96 мкмоль) N-[2-(2-{[трет-бутил(диметил)силил]окси}этил)-6-(гидроксиметил)-2Н-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида растворяли в 1.0 мл ТГФ и смешивали с 144 мкл (0.14 ммоль) 1 М раствора фторида тетрабутиламмония в ТГФ. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Смесь разбавляли с водой и экстрагировали два раза этилацетатом, и объединенные органические фазы промывали насыщенным раствором хлорида натрия, фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Это обеспечило 36 мг N-[2-(2-гидроксиэтил)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2Н-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида (пример 5).

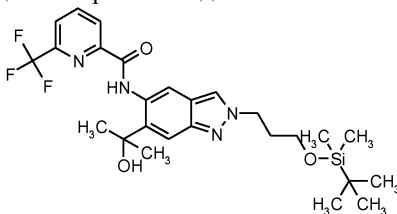
^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ [част. на млн]= 1.62 (s, 6H), 3.86 (q, 2H), 4.43 (t, 2H), 4.95 (t, 1H), 5.94 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 8.16 (dd, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.37 (t, 1H), 8.45 (d, 1H), 8.72 (s, 1H), 12.36 (s, 1H).

СЭЖХ-МС (Метод А2): $V_u=0.97$ мин (УФ-детектор: ТiС), обнаруженная масса 408.00.

Пример 6. N-[6-(2-Гидроксипропан-2-ил)-2-(3-гидроксипропил)-2Н-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида

Стадия А:

Получение N-[2-(3-{[трет-бутил(диметил)силил]окси}пропил)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2Н-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида



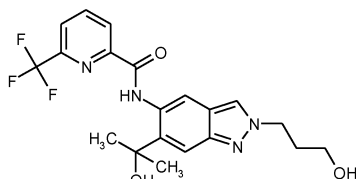
50 мг (0.09 ммоль) метил 2-(3-{[трет-бутил(диметил)силил]окси}пропил)-5-({[6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-2Н-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 4-6) растворяли в 500 мкл ТГФ и смешивали с 326 мкл (0.33 ммоль) 1 М раствора бромида метилмагния в ТГФ. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 60 мин. Затем осторожно добавляли 20 мл насыщенного раствора хлорида аммония и смесь экстрагировали дважды этилацетатом. Объединенные органические фазы фильтровали через гидрофобный фильтр, концентрировали и сушили под сниженным давлением. Остаток очищали при помощи препаративной ВЭЖХ. Получали 40 мг N-[2-(3-{[трет-бутил(диметил)силил]окси}пропил)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2Н-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида.

СЭЖХ-МС (Метод А1): $V_y=1.58$ мин

МС (ЭРИпоз): $m/z=537$ ($M+H$)⁺

¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆): δ [част. на млн]=0.02-0.05 (m, 6H), 0.84-0.91 (m, 9H), 1.62 (s, 6H), 2.02-2.18 (m, 2H), 3.55-3.62 (m, 2H), 4.45 (t, 2H), 5.96 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 8.16 (d, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.33-8.42 (m, 1H), 8.45 (d, 1H), 8.72 (s, 1H), 12.37 (s, 1H).

Стадия В:



37 мг (0.07 ммоль) N-[2-(3-{{трет-бутил(диметил)силил}окси}пропил)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2H-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида растворяли в 500 мкл ТГФ и смешивали с 207 мкл (0.21 ммоль) 1 М раствора фторида тетрабутиламмония в ТГФ. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч. Смесь разбавляли с водой и экстрагировали два раза этилацетатом, и объединенные органические фазы промывали насыщенным раствором хлорида натрия, фильтровали и концентрировали. После очистки при помощи препаративной ВЭЖХ, получали 10 мг N-[6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2-(3-гидроксипропил)-2H-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида (пример 6, содержащий вторичный компонент).

СЭЖХ-МС (Метод А2): $V_y=1.00$ мин

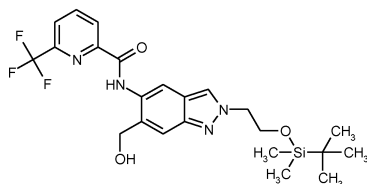
МС (ЭРИпоз): $m/z=423$ ($M+H$)⁺

¹H ЯМР выбранные сигналы (400 МГц, ДМСО-d₆): δ [част. на млн]=1.61 (s), 2.00-2.12 (m), 3.38 (t, 2H), 4.44 (t, 2H), 4.62 (br. s., 1H), 5.93 (br. s., 1H), 7.55 (s, 1H), 8.13 (d, 1H), 8.27-8.38 (m, 2H), 8.43 (d, 1H), 8.71 (s, 1H), 12.30 (br. s., 1H).

Пример 7. N-[2-(2-Гидроксиэтил)-6-(гидроксиметил)-2H-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида

Стадия А:

N-[2-(2-{{трет-Бутил(диметил)силил}окси}этил)-6-(гидроксиметил)-2H-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида



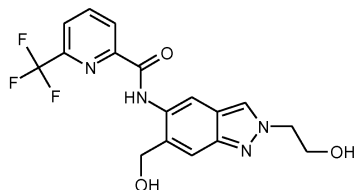
100 мг (0.19 ммоль) метил 2-(2-{{трет-бутил(диметил)силил}окси}этил)-5-({6-(трифторметил)пиридин-2-ил}карбонил)амино)-2H-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 4-5) растворяли в 1 мл ТГФ и смешивали с 191 мкл (0.38 ммоль) 2 М раствора боргидрида лития. Смесь оставляли перемешиваться при 25°C в течение 24 ч. Добавляли 14 мг (0.38 ммоль) боргидрида натрия и 500 мкл метанола, и смесь перемешивали при 25°C в течение 4 ч. Добавляли еще 14 мг (0.38 ммоль) боргидрида натрия и смесь перемешивали при 25°C в течение 24 ч. К реакционной смеси осторожно добавляли воду и органическую фазу удаляли. Затем смесь экстрагировали два раза этилацетатом, и объединенные органические фазы промывали насыщенным раствором хлорида натрия, фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Остаток ресуспендировали в 2 мл ДМСО и очищали при помощи препаративной ВЭЖХ. Это обеспечило 30 мг N-[2-(2-{{трет-бутил(диметил)силил}окси}этил)-6-(гидроксиметил)-2H-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида.

СЭЖХ-МС (Метод А2): $V_y=1.44$ мин

МС (ЭРИпоз): $m/z=495$ ($M+H$)⁺

¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆): δ [част. на млн]=-0.16 - -0.12 (m, 6H), 0.75-0.79 (m, 9H), 4.05 (t, 2H), 4.48 (t, 2H), 4.69 (d, 2H), 5.75-5.77 (m, 1H), 7.57 (s, 1H), 8.18 (dd, 1H), 8.30-8.33 (m, 1H), 8.38 (t, 1H), 8.45 (d, 1H), 8.51 (s, 1H), 11.20 (s, 1H).

Стадия В:



33 мг (0.07 ммоль) N-[2-(2-{{трет-бутил(диметил)силил}окси}этил)-6-(гидроксиметил)-2H-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида растворяли в 1 мл ТГФ и смешивали с 100 мкл (0.10

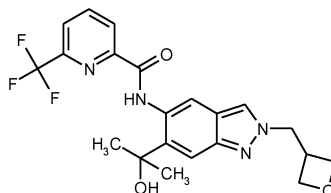
ммоль) 1 М раствора фторида тетрабутиламмония в ТГФ. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч. Смесь разбавляли с водой и экстрагировали два раза этилацетатом и объединенные органические фазы промывали насыщенным раствором хлорида натрия, фильтровали через гидрофобный фильтр, концентрировали и сушили под сниженным давлением. Получали 25 мг N-[2-(2-гидроксиэтил)-6-(гидроксиметил)-2Н-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида (Пример 7).

СЭЖХ-МС (Метод А2): $V_R=0.87$ мин

МС (ЭРИпоз): $m/z=381$ ($M+H$)⁺

¹Н ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆): δ [част. на млн]=3.87 (q, 2H), 4.44 (t, 2H), 4.69 (d, 2H), 4.98 (t, 1H), 5.70-5.81 (m, 1H), 7.57 (s, 1H), 8.11-8.23 (m, 1H), 8.31-8.42 (m, 2H), 8.43-8.49 (m, 1H), 8.51 (s, 1H), 11.20 (s, 1H).

Пример 8. N-[6-(2-Гидроксипропан-2-ил)-2-(оксетан-3-илметил)-2Н-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида



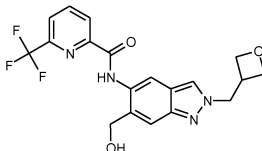
50 мг (0.12 ммоль) метил 2-(оксетан-3-илметил)-5-({[6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-2Н-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 4-1) растворяли в 500 мкл ТГФ и смешивали с 576 мкл (0.58 ммоль) 1 М раствора бромида метилмагния в ТГФ. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 60 мин. Затем осторожно добавляли 20 мл насыщенного водного раствора хлорида аммония и смесь концентрировали. Водную фазу экстрагировали дважды этилацетатом, и органические фазы объединяли, сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали. Остаток растворяли в 2.0 мл ДМСО и очищали при помощи препаративной ВЭЖХ. Содержащие продукт фракции подвергали лиофилизации. Получали 30 мг указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А2): $V_R=1.03$ мин

МС (ЭРИпоз): $m/z=435$ ($M+H$)⁺

¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ [част. на млн]=1.62 (s, 6H), 3.45-3.61 (m, 1H), 4.48 (t, 2H), 4.66 (dd, 2H), 4.72 (d, 2H), 5.94 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 8.16 (d, 1H), 8.33-8.42 (m, 2H), 8.42-8.47 (m, 1H), 8.72 (s, 1H), 12.36 (s, 1H).

Пример 9. N-[6-(Гидроксиметил)-2-(оксетан-3-илметил)-2Н-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида



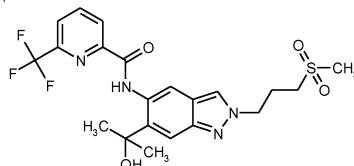
75 мг (0.17 ммоль) метил 2-(оксетан-3-илметил)-5-({[6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-2Н-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 4-1) растворяли в 1 мл смеси ТГФ/метанол (1:1) и добавляли 8 мг (0.21 ммоль) боргидрида натрия. Смесь оставляли перемешиваться при 25°C в течение 60 мин. Реакционную смесь концентрировали и остаток смешивали с водой. Суспензию энергично перемешивали в течение 15 мин и твердые вещества отфильтровывали путем отсасывания, промывали два раза водой и два раза диэтиловым эфиром и сушили под сниженным давлением. Получали 48 мг указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А2): $V_R=0.94$ мин

МС (ЭРИпоз): $m/z=407$ ($M+H$)⁺

¹Н ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆): δ [част. на млн]=3.55 (s, 1H), 4.48 (t, 2H), 4.61-4.77 (m, 6H), 7.57 (s, 1H), 8.18 (dd, 1H), 8.33-8.49 (m, 3H), 8.51 (s, 1H), 11.21 (s, 1H).

Пример 10. N-{6-(2-Гидроксипропан-2-ил)-2-[3-(метилсульфонил)пропил]-2Н-индазол-5-ил}-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида



Смесь из 500 мг (1.32 ммоль) N-[6-(2-гидроксипропан-2-ил)-1Н-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида (промежуточное соединение 5-1), 569 мг карбоната калия и 114 мг йодида калия в 5.0 мл ДМФА перемешивали при комнатной температуре в течение 15 мин. Добавляли 414 мг 1-бром-3-(метилсульфонил)пропана и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Добавляли воду, смесь два раза экстрагировали этилацетатом и экстракты промывали раствором хлорида

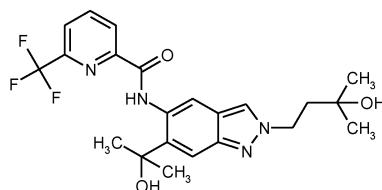
натрия и концентрировали. Остаток очищали колоночной хроматографией (дихлорметан/метанол градиент). Экстракция фракции продукта путем перемешивания с диэтиловым эфиром обеспечивала 59 мг указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А2): $V_R=1.02$ мин

МС (ЭРИпоз): $m/z=485$ ($M+H$)⁺

¹H ЯМР (300 МГц, DMSO- d_6): δ [част. на млн]=1.63 (s, 6H), 2.26-2.42 (m, 2H), 2.99 (s, 3H), 3.06-3.16 (m, 2H), 4.55 (t, 2H), 5.96 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 8.16 (d, 1H), 8.33-8.48 (m, 3H), 8.73 (s, 1H), 12.37 (s, 1H).

Пример 11. N-[2-(3-Гидрокси-3-метилбутил)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2H-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамид



Способ получения 1:

705 мг (1.57 ммоль) метил 2-(3-гидрокси-3-метилбутил)-5-({[6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-2H-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 4-4) сначала загружали в 10 мл ТГФ и охлаждали в охлаждающей бане с ледяной водой. Добавляли 2,6 мл (5.0 экв.) 3 М раствора бромида метилмагния (в диэтиловом эфире) и смесь оставляли перемешиваться при охлаждении на ледяной бане в течение 1 ч и при комнатной температуре в течение 4,5 ч. Добавляли еще 1 экв. раствора бромида метилмагния и смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 20,5 ч. Снова добавляли еще 1 экв. раствора бромида метилмагния и смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 22 ч. Реакционную смесь смешивали с насыщенным водным раствором хлорида аммония, перемешивали и экстрагировали три раза этилацетатом. Объединенные органические фазы промывали раствором хлорида натрия, фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Это обеспечило 790 мг остатка, который очищали при помощи препаративной ВЭЖХ. Это обеспечило 234 мг указанного в заголовке соединения и 164 мг фракции продукта, который экстрагировали при перемешивании с диэтиловым эфиром. После фильтрации путем отсасывания с последующей сушкой, получали дополнительные 146 мг указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А1): $V_R=1.10$ мин (УФ детектор: ТІС), обнаруженная масса 450.00.

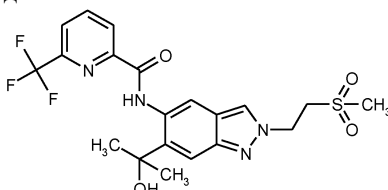
¹H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6): δ [част. на млн]=1.14 (s, 6H), 1.61 (s, 6H), 1.99-2.08 (m, 2H), 4.42-4.55 (m, 3H), 5.93 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 8.15 (dd, 1H), 8.32-8.39 (m, 2H), 8.41-8.47 (m, 1H), 8.70 (s, 1H), 12.34 (s, 1H).

Способ получения 2:

Смесь из 500 мг (1.37 ммоль) N-[6-(2-гидроксипропан-2-ил)-1H-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида (промежуточное соединение 5-1), 569 мг карбоната калия и 114 мг йодида калия в 5 мл ДМФА перемешивали при комнатной температуре в течение 15 мин. Добавляли 344 мг (1.5 экв.) 4-бром-2-метилбутан-2-ола и смесь нагревали до 100°C в течение 2 ч. Добавляли еще 0.5 экв. 4-бром-2-метилбутан-2-ола и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. К смеси подмешивали воду и экстрагировали два раза этилацетатом, и объединенные органические фазы промывали насыщенным раствором хлорида натрия и фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат). Это обеспечило 100 мг фракции продукта, который экстрагировали при перемешивании с диэтиловым эфиром. После сушки получали 60 мг указанного в заголовке соединения.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6): δ [част. на млн]=1.14 (s, 6H), 1.61 (s, 6H), 1.99-2.07 (m, 2H), 4.43-4.52 (m, 3H), 5.94 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 8.15 (dd, 1H), 8.33-8.40 (m, 2H), 8.42-8.48 (m, 1H), 8.71 (s, 1H), 12.35 (s, 1H).

Пример 12. N-{6-(2-Гидроксипропан-2-ил)-2-[2-(метилсульфонил)этил]-2H-индазол-5-ил}-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамид



160 мг (0.44 ммоль) N-[6-(2-гидроксипропан-2-ил)-1H-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида (промежуточное соединение 5-1) суспендировали вместе с 182 мг карбоната калия и 36 мг йодида калия в 1.0 мл ДМФА и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 мин.

Затем добавляли 123 мг 2-бромэтилметилсульфона (0.66 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Добавляли воду, смесь экстрагировали дважды этилацетатом и экс-

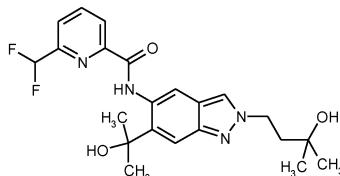
тракты промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Очистка остатка при помощи препаративной ВЭЖХ обеспечивала 20 мг указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ (Метод А2): Ву=1.01 мин;

МС (ЭРИпоз): $m/z=471$ (M+H)₊.

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ [част. на млн]=1.63 (s, 6H), 2.90 (s, 3H), 3.85 (t, 2H), 4.86 (t, 2H), 5.97 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 8.13-8.19 (m, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.41-8.48 (m, 2H), 8.74 (s, 1H), 12.37 (s, 1H).

Пример 13. 6-(Дифторметил)-N-[2-(3-гидрокси-3-метилбутил)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2H-индазол-5-ил]пиридин-2-карбоксамид



Способ получения 1:

Смесь из 250 мг 6-(дифторметил)-N-[6-(2-гидроксипропан-2-ил)-1H-индазол-5-ил]пиридин-2-карбоксамид (сырой продукт промежуточного соединения 5-2), 144 мг йодида калия и 239 мг карбоната калия в 2.5 мл ДМФА перемешивали при комнатной температуре в течение 15 мин. Добавляли 145 мг (0.87 ммоль) 4-бром-2-метилбутан-2-ола, смесь перемешивали при 110°C в течение 3 ч, добавляли еще 96 мг 4-бром-2-метилбутан-2-ола и смесь перемешивали при 110°C в течение 4 ч. Добавляли воду, смесь экстрагировали дважды этилацетатом и экстракт промывали полунасыщенным водным раствором хлорида натрия, фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Очистку осуществляли колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат). Получали 61 мг указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А1): Ву=1.00 мин (УФ-детектор: Т1С), обнаруженная масса 432.00.

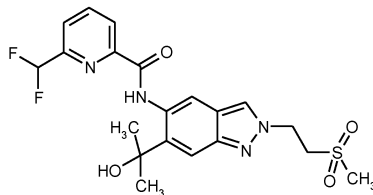
¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆): δ [част. на млн]=1.14 (s, 6H), 1.63 (s, 6H), 1.97-2.08 (m, 2H), 4.41-4.55 (m, 3H), 5.99 (s, 1H), 7.03 (t, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.94-8.00 (m, 1H), 8.24-8.38 (m, 3H), 8.71 (s, 1H), 12.49 (s, 1H).

Способ получения 2:

Аналогично получению примера 11 (способ получения 1), 3.00 г метил 5-({[6-(дифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-2-(3-гидрокси-3-метилбутил)-2H-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 4-11) вводили в реакцию с 3 М раствором бромида метилмагния (в диэтиловом эфире).

После очистки сырого продукта путем экстрактивного перемешивания с диэтиловым эфиром с последующей препаративной ВЭЖХ, получали 1,37 г указанного в заголовке соединения.

Пример 14. 6-(Дифторметил)-N-{6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2-[2-(метилсульфонил)этил]-2H-индазол-5-ил}пиридин-2-карбоксамид



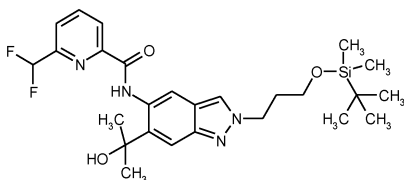
Смесь из 250 мг 6-(дифторметил)-N-[6-(2-гидроксипропан-2-ил)-1H-индазол-5-ил]пиридин-2-карбоксамид (сырой продукт промежуточного соединения 5-2), 144 мг йодида калия и 239 мг карбоната калия в 2.5 мл ДМФА перемешивали при комнатной температуре в течение 15 мин. Добавляли 162 мг 2-бромэтилметилсульфона (0.87 ммоль) и смесь перемешивали при 110°C в течение 3 ч. Добавляли воду, смесь экстрагировали дважды этилацетатом и экстракт промывали полунасыщенным водным раствором хлорида натрия, фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Остаток очищали при помощи препаративной ВЭЖХ и фракции продукта дополнительно очищали путем очистки колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат). Получали 40 мг указанного в заголовке соединения.

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ [част. на млн]=1.65 (s, 6H), 2.90 (s, 3H), 3.85 (t, 2H), 4.85 (t, 2H), 6.03 (s, 1H), 7.04 (t, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.98 (d, 1H), 8.25-8.36 (m, 2H), 8.43 (s, 1H), 8.75 (s, 1H), 12.52 (s, 1H).

Пример 15. 6-(Дифторметил)-N-[6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2-(3-гидроксипропил)-2H-индазол-5-ил]пиридин-2-карбоксамид

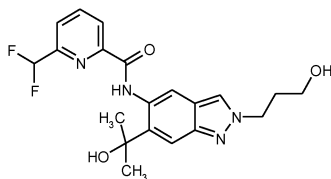
Стадия А:

Получение N-[2-(3-{трет-бутил(диметил)силил}окси)пропил)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2H-индазол-5-ил]-6-(дифторметил)пиридин-2-карбоксамид



Смесь из 250 мг 6-(дифторметил)-N-[6-(2-гидроксипропан-2-ил)-1H-индазол-5-ил]пиридин-2-карбоксамида (промежуточное соединение 5-2), 48 мг йодида калия и 239 мг карбоната калия в 2.5 мл ДМФА перемешивали при комнатной температуре в течение 15 мин. Добавляли 219 мг (0.87 ммоль, 1.5 эквивалентов) (3-бромпропокси)(трет-бутил)диметилсилана и смесь перемешивали при 110°C в течение 3 ч. Добавляли еще 1 экв. (3-бромпропокси)(трет-бутил)диметилсилана и смесь перемешивали при 100°C в течение 4 ч. Добавляли воду, смесь экстрагировали этилацетатом и экстракт промывали водным раствором хлорида натрия, фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Остаток очищали колоночной хроматографией (гексан/этилацетат). Получали 92 мг указанного в заголовке соединения.

Стадия В:

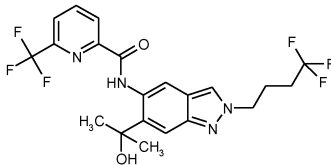


Аналогично получению примера 6, стадия В, 92 мг N-[2-(3-{[трет-бутил(диметил)силил]окси}пропил)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2H-индазол-5-ил]-6-(дифторметил)пиридин-2-карбоксамида вводили в реакцию с 0.53 мл 1 М раствора фторида тетрабутиламмония в ТГФ в течение 1 ч. Водная обработка как в примере 6 и очистка при помощи препаративной ВЭЖХ обеспечивала 46 мг указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А1): V_R =0.92 мин (УФ-детектор: Т1С), обнаруженная масса 404.00.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ [част. на млн]=1.64 (s, 6H), 2.05 (quin, 2H), 3.35-3.46 (m, 2H), 4.45 (t, 2H), 4.64 (t, 1H), 5.99 (s, 1H), 7.04 (t, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.95-7.99 (m, 1H), 8.25-8.36 (m, 3H), 8.73 (s, 1H), 12.50 (s, 1H).

Пример 16. N-[6-(2-Гидроксипропан-2-ил)-2-(4,4,4-трифторбутил)-2H-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида

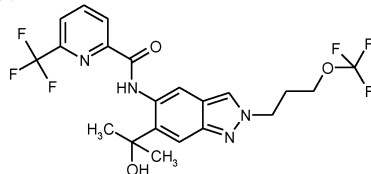


Смесь из 210 мг (0.58 ммоль) N-[6-(2-гидроксипропан-2-ил)-1H-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида (промежуточное соединение 5-1) в 3 мл ДМФА смешивали с 0.11 мл (0.87 ммоль) 1,1,1-трифтор-4-йодбутана и 239 мг карбоната калия и смесь перемешивали при 80°C в течение 6 ч. После добавления воды смесь экстрагировали три раза этилацетатом и объединенные органические фазы промывали насыщенным раствором хлорида натрия, фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Сырой продукт очищали при помощи препаративной ВЭЖХ. Получали 19 мг указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А1): V_R =1.27 мин (УФ-детектор: Т1С), обнаруженная масса 474.15.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ [част. на млн]=1.62 (s, 6H), 2.10-2.33 (m), 4.49 (t, 2H), 5.94 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 8.13-8.18 (m, 1H), 8.32-8.41 (m, 2H), 8.41-8.47 (m, 1H), 8.72 (s, 1H), 12.35 (s, 1H).

Пример 17. N-[6-(2-Гидроксипропан-2-ил)-2-[3-(трифторметокси)пропил]-2H-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида



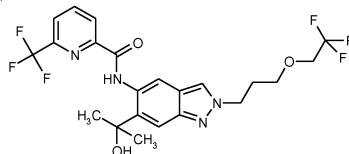
150 мг (0.33 ммоль) N-[6-(2-гидроксипропан-2-ил)-1H-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида (промежуточное соединение 5-1) сначала загружали в 2 мл ТГФ. Добавляли 58 мг (0.40 ммоль) 3-(трифторметокси)пропан-1-ола, 131 мг трифенилфосфина и 71 мкл диизопропил азодикарбоксилата (DIAD, CAS 2446-83-5), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 19 ч. Добавляли 0.83 мл раствора гидроксида натрия (2М) и смесь перемешивали при 40°C в течение 5 ч. Смесь разбавляли с водой и экстрагировали три раза этилацетатом, и объединенные органические фазы концентрировали и очищали при помощи препаративной ВЭЖХ. Получали 16 мг указанного в заголовке соеди-

нения в виде сырого продукта.

СЭЖХ-МС (Метод А2): $V_u=1.26$ мин (УФ-детектор: ТІС), обнаруженная масса 490.14.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6 , выбранные сигналы): δ [част. на млн]=1.61 (s, 6H), 1.84 (d, 1H), 2.32 (quint, 2H), 4.08 (t, 2H), 4.51 (t, 2H), 7.58 (s, 1H), 8.15 (d, 1H), 8.31-8.39 (m, 2H), 8.44 (d, 1H), 8.72 (s, 1H), 12.35 (s, 1H).

Пример 18. N-{6-(2-Гидроксипропан-2-ил)-2-[3-(2,2,2-трифторэтоксипропил)-2H-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида

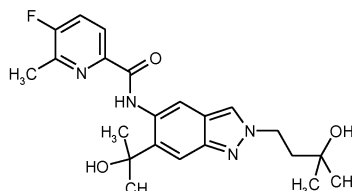


Аналогично получению примера 11 (способ получения 1), 52 мг (0.10 ммоль) метил 2-[3-(2,2,2-трифторэтоксипропил)-5-({[6-(трифторметил)пиридин-2-ил]карбонил}амино)-2H-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 4-10) в 3 мл ТГФ вводили в реакцию с 2×171 мкл 3 М раствора бромида магния в диэтиловом эфире. Очистка при помощи препаративной ВЭЖХ обеспечивала 12 мг указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А1): $V_u=1.25$ мин (УФ-детектор: ТІС), обнаруженная масса 504.16.

^1H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ [част. на млн]=1.63 (s, 6H), 2.20 (quin, 2H), 3.58 (t, 2H), 4.05 (q, 2H), 4.47 (t, 2H), 5.94 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 8.15 (dd, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.36 (t, 1H), 8.45 (d, 1H), 8.73 (s, 1H), 12.36 (s, 1H).

Пример 19. 5-Фтор-N-[2-(3-гидрокси-3-метилбутил)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2H-индазол-5-ил]-6-метилпиридин-2-карбоксамида

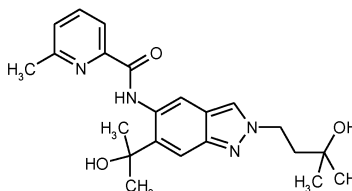


228 мг (0.31 ммоль) метил 5-{{[5-фтор-6-метилпиридин-2-ил]карбонил}амино}-2-(3-гидрокси-3-метилбутил)-2H-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 4-8) сначала загружали в 4.5 мл ТГФ и охлаждали на ледяной бане. Добавляли 0.63 мл 3 М раствора бромида метилмагния (в диэтиловом эфире) и смесь оставляли перемешиваться при охлаждении ледяной баней в течение 2 ч и при комнатной температуре в течение 21 ч. Реакционную смесь смешивали с насыщенным водным раствором хлорида аммония и экстрагировали три раза этилацетатом. Объединенные органические фазы концентрировали. Остаток очищали при помощи препаративной ВЭЖХ. Получали 82 мг указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А2): $V_u=1.03$ мин (УФ-детектор: ТІС), обнаруженная масса 414.21.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ [част. на млн]=1.13 (s, 6H), 1.63 (s, 6H), 1.99-2.05 (m, 2H), 2.55-2.59 (m, 3H), 4.42-4.50 (m, 3H), 5.95 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.83 (t, 1H), 8.05 (dd, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 12.33 (s, 1H).

Пример 20. N-[2-(3-Гидрокси-3-метилбутил)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2H-индазол-5-ил]-6-метилпиридин-2-карбоксамида



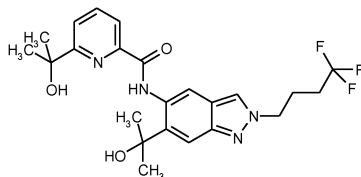
278 мг (0.48 ммоль) метил 2-(3-гидрокси-3-метилбутил)-5-{{[6-метилпиридин-2-ил]карбонил}амино}-2H-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 4-9) сначала загружали в 5.0 мл ТГФ и охлаждали на ледяной бане. Добавляли 0,97 мл 3 М раствора бромида метилмагния (в диэтиловом эфире) и смесь оставляли перемешиваться при охлаждении ледяной баней в течение 2 ч и при комнатной температуре в течение 20,5 ч. Добавляли еще 0,48 мл 3 М раствора бромида метилмагния и смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 67 ч. Смесь смешивали с насыщенным водным раствором хлорида аммония и экстрагировали три раза этилацетатом, и экстракты промывали раствором хлорида натрия, фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Остаток очищали при помощи препаративной ВЭЖХ. Получали 111 мг указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А2): $V_u=0.97$ мин (УФ-детектор: ТІС), обнаруженная масса 396.22.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ [част. на млн]=1.15 (s, 6H), 1.64 (s, 6H), 2.00-2.08 (m, 2H), 2.61 (s, 3H), 4.41-4.59 (m, 3H), 5.92 (s, 1H), 7.50 (dd, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.90-7.99 (m, 2H), 8.33 (s, 1H), 8.70 (s, 1H),

12.39 (s, 1H).

Пример 21. 6-(2-Гидроксипропан-2-ил)-N-[6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2-(4,4,4-трифторбутил)-2H-индазол-5-ил]пиридин-2-карбоксамид

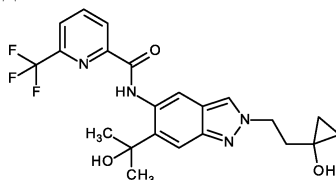


Раствор 72 мг (0.16 ммоль) метил 5-([6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-2-ил]карбонил)амино-2-(4,4,4-трифторбутил)-2H-индазол-6-карбоксилата (промежуточное соединение 4-7) в 10 мл ТГФ охлаждали в охлаждающей бане со льдом/водой. Добавляли 0.26 мл 3 М раствора бромида метилмагния в диэтиловом эфире и смесь перемешивали в течение 2 ч и затем при комнатной температуре в течение 20 ч. Добавляли еще 1 экв. 3 М раствора бромида метилмагния и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Добавляли насыщенный водный раствор хлорида аммония, смесь три раза экстрагировали этилацетатом и экстракты промывали раствором хлорида натрия и концентрировали. Препаративная ВЭЖХ обеспечивала 22 мг (31% от теории) указанного в заголовке соединения.

СЭЖХ-МС (Метод А2): Ву=1,15 мин (УФ-детектор: ТИС), обнаруженная масса 464.20.

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ [част. на млн]=1.56 (s, 6H), 1.64 (s, 6H), 2.07-2.34 (m, 4H), 4.49 (t, 2H), 5.32 (s, 1H), 6.05 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.87 (dd, 1H), 7.99-8.05 (m, 2H), 8.35 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 12.45 (s, 1H).

Пример 22. N-{2-[2-(1-Гидроксициклопропил)этил]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2H-индазол-5-ил}-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамид



250 мг (0.69 ммоль) N-[6-(2-гидроксипропан-2-ил)-1H-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамид (промежуточное соединение 5-1) сначала загружали в 5 мл ДМСО. Добавляли 159 мг (0.96 ммоль) 1-(2-бромэтил)циклопропанола, 285 мг карбоната калия и 171 мг йодида калия и смесь перемешивали при 100°C в течение 5 ч. Добавляли воду и смесь экстрагировали три раза этилацетатом. Объединенные органические фазы промывали раствором хлорида натрия, фильтровали через гидрофобный фильтр и концентрировали. Остаток очищали при помощи препаративной ВЭЖХ (колонок: Waters XBridge C18 5 мкм 100×30 мм, элюент А: вода + 0,1 об. % муравьиной кислоты (99%), элюент В: ацетонитрил). Лиофилизация обеспечивала 45 мг указанного в заголовке соединения.

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆): δ [част. на млн]=0.18-0.22 (m, 2H), 0.48-0.52 (m, 2H), 1.62 (s, 6H), 2.08 (t, 2H), 4.54-4.60 (m, 2H), 5.36 (s, 1H), 5.96 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 8.16 (dd, 1H), 8.34-8.39 (m, 2H), 8.45 (d, 1H), 8.72 (s, 1H), 12.36 (s, 1H).

Оценка физиологической эффективности при различных аутоиммунных заболеваниях

Анализ IRAK4 киназы

Ингибирующую IRAK4 активность веществ в соответствии с изобретением измеряли в анализе IRAK4 TR-FRET (TR-FRET = время разрешенный флуоресцентный индуктивно-резонансный перенос энергии), описанном ниже в настоящей заявке.

В качестве фермента использовали рекомбинантный белок слияния из N-концевой GST (глутатион S-трансфераза) и IRAK4 человека, экспрессированный в клетках насекомых, инфицированных бакуловирусом (Hi5, BTI-TN-5B1-4, клеточную линию приобретали у Invitrogen, каталожный № B855-02) и очищенных с помощью аффинной хроматографии. Применяемый для киназной реакции субстрат представлял собой биотинилированный пептид биотин-Ahx-KKARFSRFAGSSPSQASFAEPG (C-конец в амидной форме), который можно приобрести, например, у Biosyntan GmbH (Berlin-Buch).

Для анализа получали 11 различных концентраций в диапазоне от 20 мкМ до 0,073 нМ из 2 мМ раствора тестируемого вещества в ДМСО. 50 нл соответствующего раствора пипетировали в черный низкочувствительный 384-луночный микротитрационный планшет (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Германия), добавляли 2 мкл раствора IRAK4 в буфере для анализа [50 мм HEPES pH 7.5, 5 мм MgCl₂, 1.0 мм дитиотреитол, 30 мкМ активированного ортованадата натрия, 0.1% (мас./об.) бычьего гамма-глобулина (BGG), 0.04% (об./об.) нонидет-Р40 (Sigma)] и смесь инкубировали в течение 15 мин. для обеспечения предварительного связывания веществ с ферментом перед киназной реакцией. Затем инициировали киназную реакцию путем добавления 3 мкл раствора аденозинтрифосфата (АТФ, 1.67 мМ = конечная концентрация в 5 мкл анализируемого объема: 1 мМ) и пептидного субстрата (0.83 мкМ = конечная концентрация в 5 мкл анализируемого объема: 0.5 мкМ) в буфере для анализа, и полученную в результате смесь инкубировали при 22°C в течение времени реакции 45 мин. Концентрацию IRAK4 регулировали до соответствующей

активности фермента и устанавливали такой, которая обеспечивала проведение анализа в линейном диапазоне. Типичные концентрации составляли около 0.2 нМ. Реакцию останавливали добавлением 5 мкл раствора детектирующих реагентов TR-FRET [0.1 мкм стрептавидин-XL665 (Cisbio Bioassays; Франция, каталожный № 610SAXLG)] и 1.5 нМ анти-фосфосеринового антитела [Merck Millipore, "STK Antibody", каталожный № 35-002] и 0.6 нМ LANCE EU-W1024-меченого анти-мышинного-IgG антитела (Perkin-Elmer, № продукта AD0077; альтернативно можно использовать меченое кривотом тербия анти-мышинное-IgG антитело от Cisbio Bioassays) в водном растворе ЭДТУ (100 мМ EDTA, 0.4% [мас./об.] бычьего сывороточного альбумина [BSA] в 25 мМ HEPES pH 7.5).

Полученную в результате смесь инкубировали при 22°C в течение 1 ч для обеспечения образования комплекса биотинилированного фосфорилированного субстрата и детектирующих реагентов. Количество фосфорилированного субстрата затем оценивали путем измерения резонансного переноса энергии от меченого хелатом европия анти-мышинного-IgG антитела к стрептавидин-XL665. Для этой цели измерения флуоресценции на длинах волн 620 нм и 665 нм измеряли после возбуждения на длине волны 350 нм в измерительном приборе TR-FRET, например, Rubystar (BMG Labtechnologies, Оффенбург, Германия) или Viewlux (Perkin-Elmer). Соотношение испусканий на длинах волн 665 и 622 нм принимали в качестве меры количества фосфорилированного субстрата. Данные нормализовали (ферментативная реакция без тестируемого вещества = 0% ингибирования; все остальные компоненты анализируемой среды, но без фермента = 100% ингибирования). Обычно, тестируемые вещества тестировали на одних и тех же микротитрационных планшетах в 11 различных концентрациях в диапазоне от 20 мкМ до 0.073 нМ (20, 5.7, 1.6, 0.47, 0.13 мкМ, 38, 11, 3.1, 0.89, 0.25 и 0.073 нМ). Серии разбавлений готовили перед анализом (от 2 мМ до 7.3 нМ в 100% ДМСО) путем серийных разбавлений. Значения IC_{50} были рассчитаны путем подбора по 4 параметрам.

Таблица 1. Значения IC_{50} примерных соединений в анализе киназы IRAK4

Пример	IC_{50} [нМ]
1	30.6
2	135.6
3	7.2
4	52.7
5	264.5
6	35.7
7	867.3
8	15.0
9	103.8
10	18.5
11	3.4
12	10.7
13	1.3
14	10.8
15	12.3
16	21.5
17	36.0
18	47.5
19	8.9
20	13.3
21	117.2
22	3.7

Ингибирующую активность соединений общей формулы (III) по отношению к IRAK4 равным образом измеряли в описанном выше анализе IRAK4 TR-FRET. В качестве примера упоминаются следующие: промежуточное соединение 4-2 с IC_{50} =21.7 нМ, промежуточное соединение 4-3 с IC_{50} =13.0 нМ и промежуточное соединение 4-4 с IC_{50} =6.2 нМ.

Секреция TNF-α в клетках THP-1

При помощи этого теста можно протестировать вещества на их способность ингибировать секрецию TNF-α (фактор некроза опухоли-альфа) в клетках THP-1 (линия клеток острого моноцитарного лейкоза человека). TNF-α является ключевым цитокином, участвующим в воспалительных процессах указанных аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, псориатический артрит, болезнь Бехтерева, псориаз, болезнь Крона, язвенный колит и т.д. В этом тесте секрецию TNF-α запускают путем инкубирования с бактериальным липополисахаридом (ЛПС).

Клетки THP-1 выдерживали в непрерывной суспензионной клеточной культуре [среда RPMI 1460 с L-глутаматом (Gibco, кат. № 61870-044) дополненная 10% фетальной бычьей сывороткой (FCS) (Invitrogen, кат. № 10082-147), 1% смеси пенициллин/стрептомицин (Gibco BRL, кат. № 15140-114)] и концентрация клеток не должна превышать 1×10^6 клеток/мл. Анализ осуществляют в среде для культивирования клеток (среда RPMI 1460 с L-глутаматом, дополненная FCS 10%).

В каждом случае 2-2,5 мкл клеточной суспензии (соответствует 4000 клеткам) на лунку распреде-

ляли в 384-луночный планшет для тестирования (Greiner, кат. № 784076), в каждой из которых 40-50 нл вещества было растворено в 100% ДМСО. Это было сделано с использованием 10 различных концентраций в диапазоне от 20 мкМ до 0.073 нМ для каждого вещества. Клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем в каждую лунку распределяли 2-2.5 мкл 0.1 мкг/мл ЛПС (Sigma, Escherichia coli 055:B5, кат. № L5418), растворенного в среде для культивирования клеток (конечная концентрация 0.05 мкг/мл). В качестве нейтрального контроля клетки обрабатывали концентрацией ЛПС в 0.05 мкг/мл и 1% ДМСО и, в качестве контроля ингибитора только посредством 1% ДМСО.

Планшеты центрифугировали при 80 g в течение 30 с и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ и 95% атмосферной влажности в течение 17 ч. Количество TNF-α определяли с использованием набора для детектирования TNF-альфа HTRF (Cisbio, кат. № 62TNFPEB/C). Для этой цели в каждом случае 2 мкл детектирующего раствора, состоящего из конъюгата анти-TNF-α-XL665 и конъюгата анти-TNF-α-криптата, растворенных в восстанавливающем буфере в соответствии с инструкциями изготовителя, добавляли для проведения теста HTRF (гомогенная флуоресценция с временным разрешением). После добавления смесь инкубировали или при комнатной температуре в течение 3 ч, или при 4°C в течение ночи. Затем сигналы считывали на длинах волн 620/665 нм, с использованием поддерживаемого HTRF измерительного прибора, такого как BMG PheraStar.

Активность веществ выражали в процентах в виде соотношения между нейтральным контролем и контрольным ингибитором. Значения IC₅₀ были рассчитаны путем подбора по 4 параметрам.

Таблица 2. Значения IC₅₀ примерных соединений в отношении секреции TNF-α в клетках THP-1

Пример	IC ₅₀ [мкМ]
1	1.0
2	15.1
3	0.7
4	5.6
5	5.4
6	0.9
7	16.4
8	1.0
9	6.5
10	1.0
11	0.2
12	0.3
13	0.1
14	0.2
15	0.2
16	0.2
17	0.5
18	0.3
19	0.1
20	0.2
21	1.8

Вызванная посредством ЛПС (липолисахаридов) выработка цитокинов in vitro в МКПК (моноклеарные клетки периферической крови) человека)

Исследовали воздействие соединений общей формулы (I) на вызванную выработку цитокинов в МКПК человека. В данном случае выработку цитокинов вызывали с помощью ЛПС, лиганда TLR4, который приводит к активации IRAK4-опосредованного сигнального пути.

МКПК человека получали из антикоагулированной цельной крови человека. Для этой цели 15 мл среды фиколл-пак (Biochrom, кат. № L6115) изначально пипетировали в пробирки Leucosep и добавляли 20 мл крови человека. После центрифугирования крови при 800 g в течение 15 мин при комнатной температуре, плазму, включая тромбоциты, удаляли и отбрасывали. МКПК переносили в центрифужные пробирки и доливали PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) (Gibco, кат. № 14190). Суспензию клеток центрифугировали при комнатной температуре при 250 g в течение 10 мин и супернатант отбрасывали. МКПК ресуспендировали в полной среде (RPMI 1640, без L-глутамина (PAA, кат. № E15-039), 10% FCS; 50 Ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (PAA, кат. № P11-010) и 1% L-глутамина (Sigma, кат. № G7513)).

Анализ также проводили в полной среде. МКПК высевали в 96-луночные планшеты при плотности клеток 2,5×10⁵ клеток/лунку. Соединения общей формулы (I) подвергали серийному разбавлению в постоянном объеме 100% ДМСО и использовали в анализе в 8 различных концентрациях в диапазоне от 10 мкМ до 3 нМ таким образом, что конечная концентрация ДМСО составляла 0,4% ДМСО. Затем перед фактической стимуляцией клетки предварительно инкубировали с ними в течение 30 мин. Для индуцирования секреции цитокинов клетки стимулировали посредством 0,1 мкг/мл ЛПС (Sigma, Escherichia coli

0128:B12, кат. № L2887) в течение 24 ч. Жизнеспособность клеток определяли с использованием люминесцентного анализа CellTiter-Glo (Promega, кат. № G7571 (G755/G756A)) в соответствии с инструкциями изготовителя. Количество секретируемого TNF- α в супернатанте культуры клеток определяли с использованием набора Human ProInflammatory 9-Plex Tissue Culture Kit (MSD, кат. № K15007B) в соответствии с инструкциями изготовителя. В качестве примера, примерное соединение 11 и примерное соединение 12 обладают активностью ≤ 1 мкМ.

In vitro TLR-4/TLR-7-индуцированная секреция интерлейкина (IL)-23 дендритных клеток (ДК) человека

Исследовали воздействие соединений общей формулы (I) на индуцированное продуцирование провоспалительного цитокина IL-23, который играет значительную роль для генерации клеток TH-17 (Т-хелперные клетки, продуцирующие IL-17) в ДК человека. Установлено, что клетки TH-17 играют решающую роль в патогенезе нарушений, таких как ревматоидный артрит, псориаз, псориатический артрит, болезнь Бехтерева (анкилозирующий спондилоартрит) или рассеянный склероз (Lubberts, Nat. Rev. Rheumatol., 2015; Marinoni et al., Auto. Immun. Highlights, 2014; Isailovic et al., J. Autoimmun., 2015; Richtlin & Krueger, Curr Opin Rheumatol. 2016 May; 28(3):204-10 Leonard et al., Allergy Asthma Proc. 2015; Araújo et al., Rev Bras Rheumatol. 2016; Staschke et al., J Immunol., 2009). Для определения воздействия соединений общей формулы (I) на продуцирование IL-23, первичные человеческие моноциты (выделенные из МПКП человека с использованием магнитного разделения [Miltenyi Biotec, Monocyte Isolation Kit, кат. № 130-091-153] с помощью добавления факторов роста (рекомбинантный человеческий GM-CSF [PeproTech, кат. № 300-03] и IL-4 [PeproTech, кат. № 200-04]) в полной среде (VLE (сверх-низкий эндотоксин) RPMI 1640 [Biochrom AG, кат. № FG1415], 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) [Gibco, кат. № 10493-106]; 50 мкМ β -меркаптоэтанола (Gibco, кат. № 31350), 50 Ед/мл пенициллина и стрептомицина [Gibco, кат. № 15140-114]) были дифференцированы в культуре в течение 6 дней, чтобы получить ДК. После сбора ДК их ресуспендировали в полной среде и высевали с плотностью клеток 2×10^7 клеток/лунку в 96-луночный планшет (Costar, кат. № 3599). Соединения общей формулы (I) подвергали серийному разведению в постоянном объеме 100% ДМСО и использовали в анализе в 9 различных концентрациях в диапазоне от 10 мкМ до 1 нМ. В данном случае обеспечивали, чтобы присутствующая концентрация ДМСО всегда составляла 0.1% ДМСО для каждой из 9 используемых концентраций. Проводили 30-минутную предварительную инкубацию ДК с соединениями общей формулы (I). После этого, ДК стимулировали для продуцирования IL-23 при помощи 10 нг/мл ЛПС (Sigma, Escherichia coli серотип 0127:B8, кат. № L3129) (лиганд TLR4) и 2.5 мкг/мл лиганда TLR7/8 R848 (Invivogen, кат. № tlrl-r848-5), оба из которых приводят к активации IRAK4-опосредованного сигнального пути, в инкубаторе (37°C, 95% rH, 5% CO₂) в течение 24 ч. По истечении этого времени инкубации в течение 24 ч супернатанты собирали и анализировали с использованием коммерчески доступного hIL-23 ELISA (eBiosciences, кат. № 88-7237-88), что проводили в соответствии с инструкциями изготовителя. Результаты ингибирования IL-23 в ДК человека показаны в качестве примера для примерного соединения 12 на фиг. 1.

Стимуляция in vitro человеческих клеток Th17 для секреции интерлейкина (IL)-17

Ингибирующее действие соединений общей формулы (I) на индуцированное продуцирование провоспалительного цитокина IL-17, который считается ключевым цитокином в патогенезе ревматоидного артрита, псориатического артрита, болезни Бехтерева (анкилозирующий спондилоартрит), реактивного артрита, псориаза, атопического дерматита, системной красной волчанки, хронических воспалительных заболеваний кишечника, а также рассеянного склероза, исследовали в человеческих клетках Th17. С этой целью сначала получали человеческие МПКП из антикоагулированной цельной крови человека следующим образом: 20 мл крови человека добавляли в пробирку Leucoser, которые изначально загружали посредством 15 мл среды фиколл-пак (Biochrom, кат. № L6115). Кровь центрифугировали при 800 g в течение 15 мин при комнатной температуре и затем плазму, включая тромбоциты, удаляли и отбрасывали. МПКП переносили в центрифужные пробирки и доливали PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) (Gibco, кат. № 14190). Суспензию клеток центрифугировали при 250 g в течение 10 мин при комнатной температуре и супернатант отбрасывали. МПКП ресуспендировали в полной среде (RPMI 1640, без L-глутамина (PAA, кат. № E15-039), 10% FCS; 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (PAA, кат. № P11-010) и 1% L-глутамина (Sigma, кат. № G7513)). Затем Т-клетки CD4⁺ выделяли магнитным разделением клеток (набор для выделения Т-клеток CD4⁺, Miltenyi Biotec, кат. № 130-096-533) на колонке (колонка LS, Miltenyi Biotec, кат. № 130-042-401) из МНПК. Полученные таким образом CD4⁺ Т клетки высевали в 96-луночные планшеты (с плоским дном, Costar, кат. № 3599) при плотности клеток 5×10^4 CD4⁺ Т клеток/лунку. Этот анализ также проводили с применением полной среды. Соединения общей формулы (I) подвергали серийному разведению в постоянном объеме 100% ДМСО и использовали в анализе при 9 различных концентрациях в диапазоне от 10 мкМ до 1 нМ, так что конечная концентрация ДМСО составляла 0,1% ДМСО. Клетки предварительно инкубировали с соответствующей концентрацией соединений общей формулы (I) в инкубаторе в течение 30 мин. Затем добавляли дифференцирующий коктейль Th17, состоящий из гранул анти-CD3/анти-CD28 (2500 гранул на 50 000 клеток; набор для активации Т-клеток, Miltenyi Biotec, кат. № 130-091-441), рекомбинантного человеческого (rh) IL-23 (20

нг/мл; eBioscience, кат. № 14-8239-63), rhIL-1beta (20 нг/мл; eBioscience, кат. № 34-8018), rhIL-6 (20 нг/мл; eBioscience, кат. № 34-8069) и RhIL-2 (100 IU/мл; eBioscience, кат. № SRP3085), с помощью которых CD4⁺ Т-клетки дифференцировались в Th17-клетки в течение 6 дней и одновременно стимулировались для выработки IL-17. После 6 дней культивирования в инкубаторе супернатанты клеточной культуры удаляли и анализировали с использованием коммерческого hIL-17 ELISA (человеческий IL-17a ELISA Ready-SET-Go, eBiosciences, кат. № 88-7176-88), который осуществляли в соответствии с инструкциями изготовителя. Результаты ингибирования дифференцировки клеток Th17 и таким образом в конечном итоге также выработки IL-17 показаны в качестве примера для демонстрационного соединения 12 на фиг. 2.

In vitro TLR7/8- или TLR9-индуцированная выработка IFN- α плазматоидных дендритных клеток человека (pDCs)

С помощью этого теста можно изучить в человеческих pDCs воздействие соединений общей формулы (I) на выработку IFN- α (интерферон-альфа), ключевого цитокина в патогенезе системной красной волчанки (Mathian et al., Arthritis Rheum, 2009; Crow M.K., Rheum Dis Clin N Am, 2010). Для этой цели, как описано выше, МПКП человека выделяли из цельной крови и плазматоидные ДК (pDCs) выделяли из них при помощи коммерчески доступного набора для разделения клеток (Miltenyi Biotec, Plasmacytoid Dendritic Cell Isolation Kit II, кат. № 130-097-415). Полученные таким образом pDC ресуспендировали в полной среде (RPMI 1640 + GlutaMax [Gibco, кат. № 61870-010], дополненной посредством 10% FBS [Gibco, кат. № 10493-106] и 50 ед. пенициллина/стрептомицина [Gibco, кат. № 15140-114]) и высевали с плотностью клеток в 5×10 клеток/лунку в 96-луночный микротитрационный планшет (Costar, кат. № 3599). Соединения общей формулы (I) подвергали серийному разбавлению в постоянном объеме 100% ДМСО и использовали в анализе в 9 различных концентрациях в диапазоне от 10 мкМ до 1 нМ. При этом было гарантировано, что присутствующая концентрация ДМСО всегда составляла 0,1% ДМСО для каждой из 9 применяемых концентраций. Проводили 30-минутную предварительную инкубацию pDC с соединениями общей формулы (I). pDC стимулировали или с лигандом TLR7/8 (имиквимод, R837, Invivogen, кат. № tlrl-imq), или с лигандом TLR9 (CPG-A, ODN2216, Invivogen, кат. № tlrl-2216-1), и это приводило к активации IRAK-4-опосредованных сигнальных путей. После инкубации в течение 24 ч супернатанты клеточной культуры удаляли и анализировали с использованием коммерчески доступного человеческого IFN- α ELISA (IFNalpha Multi-Subtype ELISA Kit, pbl Assay Science, кат. № 41105-1). Результаты ингибирования IFN- α в плазматоидных ДК человека показаны в качестве примера для иллюстративного соединения 12 на фиг. 3.

Модель in vivo воспаления, опосредованного TLR

Соединения общей формулы (I) исследовали в отношении их эффективности in vivo в модели in vivo опосредованного TLR воспаления. Эта механистическая модель в частности показывает потенциальное воздействие соединений общей формулы (I) на опосредованные TLR4 нарушения, так как была использована опосредованная ЛПС модель воспаления. В этой модели самки мышей NMRI (в возрасте приблизительно 6 недель; Charles River Laboratories, Германия) были распределены на группы по 5 животных в каждой. Здоровой контрольной группе давали лекарственную основу (этанол-арахисовое масло 10:90 об./об.), в которой было растворено вещество (наполнитель для вещества), а также лекарственную основу, в которой был растворен ЛПС. Наряду с группами лечения субстратом, группе положительного контроля также вводили внутривенно (в.б.) 0,2 мг в каждом случае ЛПС/кг массы тела (Sigma, кат. № L4391) (липополисахариды из E.coli 0111:B4). Кроме того, группе положительного контроля вводили наполнитель для вещества, описанный выше. Вещество вводили перорально за 1 ч до индукции воспаления путем введения ЛПС. Чтобы исследовать воздействие соединений общей формулы (I) на воспаление, у животных брали конечный образец крови через 1,5 ч. Концентрацию цитокинов TNF- α и IL-6 в плазме определяли с использованием наборов Ready-SET-Go ELISA мышинных TNF- α и мышинных IL-6 (eBioscience, mTNF α кат. № 88-7324-88, mIL-6 кат. № 88-7064-88) в соответствии с инструкциями производителя. Ингибиторы IRAK4 эффективны в модели опосредованного TLR воспаления. Применение ЛПС приводит к быстрой индукции провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α и IL-6 в плазме, что ингибируется дозозависимым способом при лечении соединениями общей формулы (I). Это показано в качестве примера для соединения 12 и 11 на фиг. 4. В некоторых экспериментах клинически значимые сравнительные вещества также тестировали на животной модели для сравнения эффективности ингибирования, такой как, например, антагонисты ФНО адалимумаб (Humira®) или этанерцепт, оба из которых в каждом случае вводили подкожно за 1 ч. до индукции воспаления при помощи ЛПС в дозах 1,5, 5 и 10 мг/кг.

Модель in vivo вызванного адьювантом артрита

Для определения противовоспалительной активности соединений общей формулы (I), они были исследованы в отношении их эффективности in vivo в модели артрита. Для этой цели каждому самцу крыс Льюиса (приблизительно 100-125 г, Charles River Laboratories, Германия) в основание хвоста в день 0 вводили подкожно 100 мкл полного раствора адьюванта Фрейнда (CFA) (M. tuberculosis H37Ra [Difco Lab, кат. № -231141], растворенного в неполном адьюванте Фрейнда [Difco Lab, кат. № -263910]). Каж-

дая группа насчитывала $n=8$ крыс. В исследование включали как здоровую контрольную группу, так и контрольную группу заболевания. Каждая контрольная группа получала п.о. в качестве лечения только лекарственную основу (кремофор-этанол-вода 40:10:50 объемн./объемн./объемн.) исследуемого вещества или в профилактическом порядке (с 0 дня) или терапевтическим способом (с 9 дня). Лечение различными дозами исследуемого вещества равным образом начинали или в профилактическом порядке, или терапевтическим способом путем перорального введения. В день 0 начальное состояние животных определяли заранее с точки зрения показателей активности заболевания (оценка тяжести артрита на основе системы баллов). В этой системе баллов (шкале) присваивали и суммировали баллы в зависимости от степени воспаления суставов от 0 до 4 при наличии эритемы, включая опухание суставов (0 = нет; 1 = незначительное; 2 = умеренное; 3 = выраженное; 4 = тяжелое) для обеих задних лап. Чтобы определить противовоспалительную эффективность соединений статус заболевания животных оценивали посредством оценки активности заболевания, начиная с 8-го дня, когда у животных впервые проявляются признаки артрита, а затем 3 раза в неделю до конца (20-й день). Кроме того, в ходе эксперимента силу захвата лапы животных определяли как меру гипералгезии с использованием автоматического измерителя силы захвата лап (IITC Life Science Inc., USA). В качестве меры для опухания сустава измеряли также объем лап с помощью плетизометра (IITC Life Science Inc., США). На 20 день эксперимент был окончен, и была проведена магнитно-резонансная томография в MPT (магнитно-резонансный томограф; MAGNETOM Avanto syngo MR B17, Siemens, Германия) под ингаляционной анестезией (изофлуран) с использованием последовательности MPT STIR (инверсия-восстановление для подавления жирового сигнала и для обнаружения отёков) как метода визуализации для анализа степени тяжести артрита. Кроме того, среди прочего, синовиальная жидкость была получена из артритных суставов путем внутрисуставного промывания коленного сустава посредством 150 мкл стерильного физиологического раствора и исследована на присутствие цитокинов с использованием коммерческого мультиплексного прибора ELISA от Meso Scale Discovery (MSD) (провоспалительная панель 1; кат. № K15059D-1). Биопсии коленного сустава затем использовали для анализа концентрации цитокинов (с помощью мультиплексного ELISA от MSD) или уровней CRP (крысиный C-реактивный белок, кат. № 557825, BD Bioscience) или активности эластазы (в качестве меры для инфильтрации нейтрофилов) в ткани или гистопатологически исследовали на наличие симптомов воспаления в синовии, а также во внутри- и периартикулярной ткани. С этой целью биопсии коленного сустава измельчали в охлажденной бисерной мельнице при -196°C (CryoMill; Retsch GmbH, Германия), в каждом случае 200 мг растворяли в пригодном буфере для анализа цитокинов (в 0,5 мл среды RPMI1640, Gibco) или для эластазной активности (в 1 мл гомогенатного буфера [pH 7,0; хранение при комнатной температуре; 5 г 5% бромида гексадецилтриметиламмония, 2,09 г 10 мМ MOPS, добавляли 900 мл бидистиллированной воды при $30-35^{\circ}\text{C}$]). Для количественного определения протеазной активности нейтрофильной эластазы (NE) применяли флуоресцентно-меченный субстрат [MeOSuc-AAPV-AMC (N-метоксисукцинил-Ala-Ala-Pro-Val-7-амино-4-метилкумарин), кат. № I-1270, Bachem, Германия] с высокой специфичностью к NE (Castillo et al., 1979; Wiesner et al., 2005). Рекомбинантную мышиную NE (кат. № 4517-SE-010, R&D Systems, Германия; растворенную в гомогенатном буфере, см. выше) использовали в качестве стандартной кривой, а гомогенатный буфер-в качестве холостой пробы. Для анализа эластазы в каждом случае использовали 25 мкл суставного гомогената и пипетировали в черный 96-луночный микротитрационный планшет (с плоским дном, NUNC, Германия), а затем смешивали с 25 мкл 1 мм раствора субстрата MeOSuc-AAPV-AMC в холодном буфере TrisBSA (0,1% BSA [фракция V], 0,1 М трис(гидроксиметил)аминометан, 1 М NaCl в 1 литре воды; pH 8,5; хранение при 4°C). Используя предварительно нагретый считыватель планшетов (SpectraMax M2, Molecular Devices), флуоресценцию в микротитрационном планшете измеряли через 30 минут при 37°C и $\lambda_{\text{ex}}=380$ нм и $\lambda_{\text{em}}=460$ нм, а количество нейтрофильной эластазы рассчитывали с использованием стандартной кривой NE с помощью программного обеспечения SoftmaxPro 6.4. В свою очередь для гистопатологической оценки применяли шкалу, которая в зависимости от степени повреждения соответствующего параметра (воспаление, повреждение хряща, синовиальная гиперплазия, паннус, повреждение кости, изменения периоста), присваивает баллы от 0 до 4 (0 = нет; 1 = незначительный; 2 = умеренный; 3 = значительный; 4 = тяжелый) на наличие или серьезность патологического повреждения сустава. Статистический анализ осуществляли с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и сравнения с контрольной группой при помощи многократного сравнительного анализа (тест Даннетта).

Подкожное введение CFA крысам приводит к острому артриту с отчетливым воспалением суставов у крыс. В качестве примера, эта модель крысиного артрита представляет собой воспаление суставов в случаях артритов человека, таких как псориатический артрит, ревматоидный артрит, реактивный артрит и болезнь Бехтерева (Bendele, J Musculoskel Neuron Interact 2001; McCann et al., Arthritis Res Ther, 2010). При профилактическом, а также и терапевтическом лечении Примерным соединением 11 можно было заметно ингибировать артрит, вызванный адьювантом, и данные гистологии и MPT, в частности, указывают на действие, модифицирующее заболевание, подобное действию DMARD (модифицирующего заболевание противоревматического лекарственного средства). Это представлено на фиг. 5. В некоторых экспериментах клинически значимое сравнительное вещество, т.е. антагонист ФНО этанерцепт (10 мг/кг или 25 мг/кг с 0-го дня), которое вводили подкожно каждые 3 дня, также тестировали в животной модели

для сравнения ингибирующей эффективности.

Модель *in vivo*, вызванного коллагеновым антителом артрита у мышей. Исследовали противовоспалительное воздействие соединений общей формулы (I) в еще одной мышинной модели артрита. Для этой цели самкам мышей Balb/c (в возрасте приблизительно 9 недель, Charles River Laboratories, Kingston, Канада) в 0 день каждой вводили внутривенно в хвостовую вену 200 мкл коктейля коллагенового антитела (10 мг/мл; ArthritoMab, MD Bioproducts) (за исключением здоровой контрольной группы, включенной в исследование). Затем на 6-й день каждая из этих мышей получала дополнительную внутрибрюшинную инъекцию 200 мкл ЛПС. Каждая группа насчитывала $n=10$ мышей. В исследование включали как здоровую контрольную группу, так и контрольную группу заболевания. Каждая контрольная группа получала п.о. в качестве лечения только лекарственную основу (этанол:арахисовое масло 10:90 объемн./объемн.) тестируемого вещества в профилактическом порядке (т.е. с 0 дня) или с терапевтической целью (с 9 дня). Лечение различными дозами тестируемого вещества равным образом начинали в профилактическом порядке или с терапевтической целью путем перорального введения. В течение эксперимента, степень заболевания оценивали на основе системы баллов для оценки активности заболевания на всех четырех лапах. В такой системе начисления баллов за здоровую лапу баллы не начисляли, тогда как баллы с 1 [легкое воспаление, например, пальца(ев) лапы] до 4 [сильное воспаление, распространяющееся по всей лапе] начисляли в каждом случае за определенную степень воспаления суставов, возникшего от пальцев лап через плюсневый сустав к голеностопному суставу, как описано ниже:

0 = норма;

1 = эритема или слабое опухание, ограниченное предплюсневой или голеностопным суставом или пальцами лапы;

2 = эритема или слабое опухание, простирающееся от голеностопного сустава до плюсневой кости (2 сегмента);

3 = эритема и умеренное опухание, простирающееся от голеностопного сустава до плюсневых суставов;

4 = эритема и сильное опухание, охватывающее плюсневые суставы, стопы и пальцы лап.

В то же время в ходе эксперимента объем лапы измеряли с помощью плетизометра (ITC Life Science Inc., США) в качестве меры опухания сустава. Для этого параметра начальное условие было определено заранее в каждом случае за один день до начала эксперимента (день -1), а затем оценка активности заболевания и объем лапы были оценены три раза в неделю, начиная с 8-го дня. На 21 день эксперимент был прерван, и биопсия коленного сустава была исследована на гистопатологический анализ симптомов воспаления в синовии, а также во внутри- и периартикулярной ткани. Для гистопатологической оценки также использовали шкалу, которая в зависимости от степени повреждения соответствующего рассматриваемого параметра (воспаление, повреждение хряща, синовиальная гиперплазия, паннус, повреждение кости, изменения периоста) присваивает баллы от 0 до 4. (0 = нет; 1 = незначительный; 2 = умеренный; 3 = значительный; 4 = тяжелый) на наличие или серьезность патологического повреждения сустава. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и сравнения с контрольной группой с помощью многократного сравнительного анализа (тест Даннетта).

Внутривенное введение коктейля из коллагеновых антител, включая последующее внутрибрюшинное введение ЛПС мышам приводит к острому артриту с отчетливым воспалением суставов у мышей (Holmdahl et al., APMIS 1989; McCann et al., Arthritis Res Ther, 2010) и таким образом представляет собой дополнительную модель на животных для артритических показаний псориатического артрита, ревматоидного артрита, реактивного артрита и болезни Бехтерева. При профилактическом, а также и терапевтическом лечении при помощи примерного соединения 12, можно было заметно ингибировать этот артрит, вызванный коллагеновыми антителами, и гистопатологические данные суставов задней лапы указывают на модифицирующее заболевание действие. Это представлено на фиг. 6.

Вызванная посредством MOG₃₃₋₃₅ модель *in vivo* хронического ЭАЭ (экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита) у мышей

Чтобы определить противовоспалительную активность соединений общей формулы (I), их исследовали на экспериментальной животной модели рассеянного склероза (РС) в отношении их эффективности *in vivo*. Хроническая модель ЭАЭ (экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит), вызванного посредством MOG₃₃₋₃₅ (гликопротеин миелинового олигодендроцита) ЭАЭ (экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита) является стандартной моделью на животных для тестирования фармакологических веществ для потенциального применения у пациентов с РС. С этой целью самок мышей C57BL/6 (19-20 г; Jackson Laboratories, Bar Harbor, США) рандомизировали и использовали в группе от 10 до 15 животных на группу. Применяя подкожную инъекцию в каждом случае 0,1 мл раствора, содержащего 200 мкг пептида MOG₃₃₋₃₅, эмульгированного в 100 мкл CFA (полный адъювант Фрейнда; 2 мг/мл), дополненного посредством микобактерии туберкулеза (MT; 8 мг/мл, штамм H37RA), в день 0 расстройство ЭАЭ вызывали дополнительным внутрибрюшинным введением (в 0 день и 2 день) 200 нг токсина коклюша (PTx; растворенного в 0.1 мл PBS (2 мкг/мл)), и его прогрессирование контролировали в течение 34 дней. Эксперимент также включал в себя как здоровую контрольную группу, так и контрольную группу заболевания, обе из которых лечили перорально с использованием лекарственной ос-

новы (этанол:арахисовое масло 10:90 об./об.) примерного Соединения 12. Вместо этого группы, проходящие лечение, получали разные суточные дозы примерного Соединения 12 в качестве профилактической терапии, т.е. с 0 дня, путем перорального введения. Такие параметры, как уровень заболеваемости и симптомы ЭАЭ, проверяли ежедневно. При этом симптомы ЭАЭ оценивали с использованием системы баллов, которая представляет степень тяжести расстройства (шкала активности болезни ЭАЭ):

- 0 = нормальный, здоровый;
- 1 = слабый/парализованный хвост мыши;
- 2 = слабый/парализованный хвост мыши и слабость в задних лапах;
- 3 = слабый/парализованный хвост мыши и полный паралич задних лап;
- 4 = парализованный хвост, полный паралич задних лап и частичный паралич передних лап;
- 5 = полный паралич всех передних и задних лап, эвтаназия.

На 34-й день после индукции ЭАЭ эксперимент был прекращен, и, среди прочего, у мышей была взята кровь для последующего анализа биомаркеров, а спинальный мозг был извлечен для гистопатологической оценки нейроаксиальной дегенерации и инфильтрации лимфоцитов. Для гистопатологической оценки степени тяжести расстройства, спинномозговой мозг окрашивали гематоксилином, эозином и люксолом быстрым синим, а затем нейроаксиальную дегенерацию, инфильтрацию лимфоцитов в белом веществе и инфильтрацию лимфоцитов в сером веществе затем оценивали слепо с использованием системы баллов (0 = нормально, данных нет; 1 = минимальные результаты; 2 = слабые результаты; 3 = умеренные результаты; 4 = достоверные результаты; 5 = тяжелые изменения). Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и сравнения с контрольной группой путем многократного сравнительного анализа (тест Даннетта). Посредством лечения примерным Соединением 12, можно было ингибировать индуцированный ЭАЭ, экспериментальную модель для РС. При этом примерное Соединение было сравнимо или даже превосходило эффективность стероида (преднизолон; 1 мг/кг ежедневно перорально с 0 дня) или терифлуномида (Aubagio®; 10 мг/кг ежедневно перорально с 0 дня), которые также были протестированы в эксперименте в качестве клинических сравнительных веществ. Это представлено на фиг. 7.

Модель *in vivo* псориаза у мышей, вызванного имиквимодом Соединения общей формулы (I) исследовали в отношении их противовоспалительного действия на животной модели псориаза. У мышей местное введение имиквида (IMQ) лиганда TLR7/8 и мощного иммунного активатора приводит к псориазоподобному фенотипу на коже. Таким образом, в течение 7 дней каждый день 3,5 мг имиквида (эквивалентно 70 мг 5% крема Aldara®, Meda AB) наносили местно мышам на кожу спины, которую предварительно сбрили, и на оба уха (наружно). Здоровая контрольная группа, которую также тестировали, вместо этого получала парафиновое масло. Впоследствии контрольную группу болезни IMQ, как и здоровую контрольную группу, подвергали профилактическому лечению, т.е. с 0 дня, перорально (п.о.) в сутки при помощи лекарственной основы (Solutol HS15-вода (40/60 об./об.)) тестируемого соединения. Ежедневное п.о. лечение разными дозами испытуемого соединения также начинали в 0-й день. В каждом случае размер группы составлял n=10 животных. Во время эксперимента проявление псориаза оценивали визуально каждый день с помощью системы баллов с использованием клинических показателей, описанных ниже:

Оценка	Эритема	Шелушение	Толщина кожи (спина)
0	нет	нет	нормальная
1	слабая	слабая	слабая
2	умеренная	умеренная	умеренная
3	выраженная	выраженная	выраженная
4	существенная	существенная	существенная

Параллельно с этим каждый день измеряли кожу спины и обеих ушей по толщине и/или образованию отека с использованием цифрового штангенциркуля (Kutimeter; Horex Digital Caliper, Helios-Preisser, Германия). Каждые 2 дня проверяли массу тела каждой мыши. На 7-й день эксперимент был прекращен, и после умерщвления животных кожу спины и ушей фиксировали в формалине для последующей гистопатологической оценки. Эта гистопатологическая оценка уха и кожи спины после окрашивания гематоксилином/эозином срезов парафиновой кожи (2 мкм) в микротоме (Leica, Германия) была проведена патологоанатомом в слепой форме. При этом следующие аспекты были изучены и оценены по степени их тяжести с помощью системы баллов (для каждого исследуемого параметра): паракератоз (нарушение ороговения, характеризующееся клеточными ядрами или остатками ядер клеток, остающимися в роговом слое)/гиперкератоз (чрезмерное ороговение кожи) и инфильтрация иммунных клеток в дерму или эпидермис. В данном случае каждый гистологический параметр был оценен следующим образом:

- 0 = норма;
- 1 = небольшое изменение;
- 2 = умеренное изменение;
- 3 = значительное изменение.

Затем все гистологические параметры были суммированы и представлены в виде общего гистологического показателя. Кроме того, была измерена толщина эпидермиса в сечении кожи. Опосредованное

IMQ воспаление кожи у мышей представляет собой животную модель для показания псориаза или для кожного фенотипа при псориатическом артрите (van der Fits et al., J Immunol 2009). Посредством лечения примерным соединением 12 можно было ингибировать вызванный псориаз. При этом примерное соединение было сравнимо или даже превосходило эффективность стероида (Betamethasone, Celestene®; 2,5 мг/кг перорально в сутки) или антагониста ФНО (этанерцепт; 5 мг/кг через день внутривенно), которые также были протестированы в эксперименте, в качестве клинических сравнительных веществ. Это представлено на фиг. 8.

Модель *in vivo* вызванного посредством DNFB воспаления кожи у мышей

Модель вызванного при помощи DNFB (2,4-динитро-1-фторбензола) аллергического контактного дерматита (контактная аллергия) у мышей представляет собой воспалительное заболевание кожи с фоном иммунной реакции замедленного типа (гиперчувствительность замедленного типа; DTH) в основном опосредуется Т-хелперными лимфоцитами типа 1 (клетки Th1). Эта Th1-опосредованная воспалительная реакция кожи представляет собой пример воспалительных процессов при псориазе, псориатическом артрите и аллергической контактной экземе (Roese et al., Exp Dermatol. 2012). Для запуска кожных воспалений самки мышей NMRI (22-24 г, Charles River, Германия) были предварительно сенсибилизированы, в день 0 и день 1, на выбритую кожу спины (площадь приблизительно 10 см²), используя в каждом случае 25 мкл 0,5%-ого (мас./об.) раствора DNFB (2,4-динитрофторбензол, кат. № 70-34-8, Sigma Aldrich, Германия; растворенного в ацетоне/оливковом масле; 4/1; об./об.). В каждом случае размер группы составлял n=10 мышей. Затем воспаление кожи спровоцировали на 5-й день путем местного нанесения в каждом случае 20 мкл 0,3%-ного (мас./об.) раствора DNFB (в ацетоне/оливковом масле; 4/1; об./об.) на внешнюю часть обеих ушей (площадь на ухо приблизительно 2 см²). В эксперименте также были протестированы как здоровая контрольная группа ("сенсибилизация и запуск" только растворителем ацетон/оливковое масло [4/1; об./об.]), контрольная группа заболеваний (сенсибилизация и запуск с помощью DNFB), так и контроль раздражения (сенсибилизация только растворителем, запуск при помощи с DNFB). Эти контрольные группы подвергали лечению только за 1 ч до запуска воспаления кожи лекарственной основой (этанол:арахисовое масло, 10:90 об./об.) исследуемого вещества, п.о., группы лечения получали соответствующую дозу исследуемого вещества, равным образом перорально. На 6-й день (через 24 ч после запуска воспаления) толщину уха определяли индивидуально для каждого уха, используя цифровой штангенциркуль, и определяли вес ушей каждой мыши. Путем последующего анализа в ушных гомогенатах, полученных гомогенизацией (автоматический гомогенизатор, производимый Feinmechanik-Werkstatt, Bayer AG, Германия) ушей в 1,5 мл гомогенатного буфера в течение 20 с с последующим центрифугированием (15 000 об./мин; 12°C, 20 мин) и удалением супернатантов, было возможно, среди прочего, определить активность эластазы как меру проникновения нейтрофилов в воспаленную ткань. Для количественного определения протеазной активности нейтрофильной эластазы (NE) применяли флуоресцентно меченный субстрат (MeOSuc-AAPV-AMC; кат. № 1-1270, Bachem, Германия), который является высокоспецифичным для NE (Castillo et al., 1979; Wiesner et al., 2005). В данном случае рекомбинантную мышиную NE (кат. № 4517-Se-010, R&D Systems, Германия; растворенную в гомогенатном буфере) использовали в качестве стандартной кривой, а гомогенатный буфер использовали в качестве контрольного значения. Для анализа эластазы в каждом случае применяли 25 мкл ушного гомогената и пипетировали в черный 96-луночный микротитрационный планшет (с плоским дном, NUNC, Германия), а после этого смешивали с 25 мкл 1 мм раствора субстрата MeOSuc-AAPV-AMC в холодном буфере TrisBSA. Используя предварительно нагретый считыватель планшетов (SpectraMax M2, Molecular Devices) флуоресценцию в микротитрационном планшете измеряли через 30 мин. при 37°C и $\lambda_{\text{ex}}=380$ нм и $\lambda_{\text{em}}=460$ нм, а количество нейтрофильной эластазы рассчитывали с помощью программного обеспечения SoftmaxPro 6.4, используя стандартную кривую NE.

При помощи лечения примерным соединением 11 и примерным соединением 12 можно было ингибировать ThH1-опосредованное воспаление кожи, вызванное при помощи DNFB. Это представлено на фиг. 9.

Модель *in vivo* воспаления кожи у мышей, вызванного посредством TMA

Модель вызванного посредством TMA (тримеллитовый ангидрид) аллергического контактного дерматита (контактной аллергии) у мыши представляет собой воспалительное заболевание кожи с фоном иммунной реакции замедленного типа (гиперчувствительность замедленного типа; DTH) в основном, опосредованной эозинофилами и Т-хелперными лимфоцитами типа 2 (клетки ThH2). Эта, опосредованная Th2 воспалительная реакция кожи представляет собой пример воспалительных процессов при атопическом дерматите и при контактной аллергии (Sur et al., BMC Complement Altern Med. 2015). Для запуска кожных воспалений самки мышей NMRI (22-24 г, Charles River, Германия) были предварительно сенсибилизированы, в день 0, на выбритую кожу спины (площадь приблизительно 10 см²), используя в каждом случае 50 мкл 3%-ого (мас./об.) раствора TMA (кат. № 552-30-7, Sigma Aldrich, Германия; растворенного в ацетон/изопропилмиристате; 4/1; об./об.). В каждом случае размер группы составлял n=10 мышей. Затем воспаление кожи спровоцировали на 5-й день путем местного нанесения в каждом случае 10 мкл 3%-ого (мас./об.) раствора TMA (в ацетоне/изопропилмиристате; 4/1; об./об.) на наружную сторону обеих

ушей (площадь на ухо приблизительно 2 см²). В эксперименте также были протестированы как здоровая контрольная группа ("сенсibilизация и запуск" только растворителем ацетон/изопропилмиристат [4/1; объемн./объемн.]), так и контрольная группа заболевания (сенсibilизация и запуск при помощи ТМА). Принимая во внимание, что эти контрольные группы только за 1 ч до запуска воспаления кожи, получали лекарственную основу (этанол:арахисовое масло 10:90 об./об.) тестируемого вещества п.о., группы лечения получали соответствующие дозы тестируемого вещества, равным образом перорально. На 6-й день (через 24 ч после запуска воспаления) толщину уха определяли индивидуально для каждого уха, используя цифровой штангенциркуль, и определяли вес ушей каждой мыши. При помощи последующих анализов в гомогенатах ушей, которые могут быть получены, как описано выше, можно, среди прочего, определить эластазную активность как меру проникновения нейтрофилов в воспаленную ткань, как описано выше (в разделе "Модель кожи, вызванная посредством DNFB"). Посредством лечения примерным соединением 12 можно было ингибировать опосредованное Th2 воспаление кожи, запущенное при помощи ТМА. Это представлено на фиг. 10, с использованием параметра толщины уха (толщина уха дельта = толщина уха на 6-й день за вычетом первоначальной толщины уха), который представляет собой образование отека во время процесса воспаления.

Модель in vivo колита у мыши, вызванного посредством DSS

Чтобы определить противовоспалительный потенциал соединений общей формулы (I), эти соединения оценивают на животной модели кишечного воспаления, модели колита, вызванного при помощи DSS (декстран сульфата натрия). Введение DSS через питьевую воду чувствительным мышам приводит к развитию острого кишечного воспаления (колита) с типичными клиническими симптомами, такими как кровавая диарея, потеря веса, образование отека в толстой кишке. Таким образом, это представляет собой экспериментальную модель на животных для IBD (воспалительного заболевания кишечника), которая содержит признаки болезни Крона и язвенного колита (Okaysu et al., Gastroenterol, 1990; Dieleman et al., Gastroenterol, 1994). Самцы мышей C57BL/6 (6-8 недель; Charles River, USA; n=10-12 мышей/группа) получали с 0 дня до 5 дня включительно, 3%-ый DSS (35-48 kDa; кат. № DB001; TDB Consultancy AB, Швеция), ежедневно свежеприготовленный, через питьевую воду для запуска колита. Здоровая контрольная группа (n=8 мышей), которую также тестируют, вместо этого получает нормальную питьевую воду. В каждом случае контрольные группы (здоровый контроль и контроль с заболеванием колитом) обрабатывают только лекарственной основой (этанол:арахисовое масло 10:90 об./об.) тестируемого вещества, п.о. Лечение различными дозами тестируемого вещества осуществляют профилактически, т.е. с 0 дня, путем перорального введения первой дозы DSS. При этом в ходе эксперимента, масса тела и наличие, возможно даже кровавой, диареи (оценка по балльной системе [шкала] 0-4 балла, где 0 = стул нормальной формы, 1 = стул мягкой формы, 2 = мягкий несформированный стул, 3 = водянистый стул/диарея, 4 = кровавая диарея) оценивают ежедневно. В данном случае скрытый кровавый стул обнаруживают с помощью теста гемокультуры (Кат. № 3060; Beckman Coulter, Германия). Кроме того, на 10-й день и 16-й день осуществляют видеоэндоскопию (эндоскоп Karl Storz, Германия) под ингаляционной анестезией изофлураном для оценки степени тяжести колита, где степень повреждения кишечника оценивается с использованием системы баллов (шкала) от 0 до 4 баллов, а именно:

- 0 = нормальный, здоровый;
- 1 = потеря васкуляриности;
- 2 = потеря васкуляриности и ломкость;
- 3 = ломкость и эрозии;
- 4 = образования язв и кровотечение.

После последней эндоскопии эксперимент заканчивают, кровь удаляют через полую вену, и ободочную кишку исследуют относительно её длины и массы, которые представляют, в качестве косвенных маркеров, связанное с колитом утолщение кишечной стенки, которое коррелирует с тяжестью колита. Кишечник (один кусок 2 см каждый с дистальной и проксимальной стороны) также дополнительно анализируют гистопатологически после фиксации в формалине путем окрашивания парафиновых срезов гематоксилином/эозином. Индуцированный при помощи DSS колит у мышей, экспериментальная модель хронического воспалительного заболевания кишечника (IBD), можно было ингибировать путем обработки Примерным соединением 12. Эффективность примерного соединения 12 была сопоставима с эффективностью утвержденных биопрепаратов (анти-IL-12p40 при 10 мг/кг Q3D [каждый третий день] внутривентриально с 0 дня или анти-ФНО Humira® [Адалимумаб] при 10 мг/кг Q3D подкожно с 0 дня), которые были включены в эксперимент в качестве клинически значимых эталонных веществ. Это представлено на фиг. 12.

Модель in vivo СКВ у мышей, вызванной пристаном

Для определения противовоспалительной активности соединений общей формулы (I), соединения оценивают в модели СКВ (системной красной волчанки) в отношении их эффективности in vivo. Пристан, минеральное масло (2,6,10,14-тетраметилпентадекан) после инъекции мышам приводит к системной красной волчанке с характерным поражением органов (например, нефрит, умеренный эрозивный артрит), типичной выработкой аутоантител, например, антител к двухцепочечной ДНК (ds) (Leiss et al., Lupus 2013) и зависимость от интерферона типа 1 (например, IFN-альфа) и сигналами TLR, как описано

у мужчин (Satoh et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1995; Thibault et al., Arthritis Res Ther. 2009; Thibault et al., J Clin Invest. 2008; Wu et al., Acta Pharmacol Sin. 2015; Hagberg and Rönnblom, Scand J Immunol, 2015). Таким образом, на 0 день в каждом случае внутрибрюшинно вводили 500 мкл приста́на (Sigma, кат. № 1921-70-6) самкам мышей Balb/c (20-22 г, Charles River Laboratories, США). В каждом случае размер группы составляет $n=10$ мышей. В эксперименте также тестируются как здоровая контрольная группа, так и контрольная группа заболевания. Обе контрольные группы получают только лекарственную основу (этанол:арахисовое масло 10:90 об./об.) тестируемого вещества, п.о. Лечение различными дозами тестируемого вещества осуществляют профилактически, т.е. с 0 дня, путем перорального введения через приблизительно 1 ч. после инъекции приста́на. Кроме того, в день 0 определяют базовый уровень животных в отношении статуса белка в моче (протеинурия, измеренная с использованием кумасси бриллиантового синего G 250 с BSA [бычий сывороточный альбумин] в качестве эталона), концентрацию аутоантител (например, анти-dsДНК) и значения креатинина в сыворотке и объем лапы (с помощью плетизометра). В ходе эксперимента затем эти параметры контролируют объем лапы каждую неделю, статус белка в моче и аутоантитела и креатинин в сыворотке крови на 2, 4 и 6 неделе после инъекции приста́на. Через шесть недель после запуска СКВ приста́ном эксперимент заканчивают и почки фиксируют в 10% нейтрально-буферном формалине для гистопатологической оценки, а затем 5-мкм парафиновые срезы оценивают патологически путем окрашивания гематоксилином и эозином (H&E). В данном случае гистологические данные оценивают и классифицируют с использованием системы баллов (0 = здоровые, 1 = минимальные изменения почечной ткани, 2 = незначительные изменения, 3 = умеренные изменения, 4 = заметные изменения почечной ткани). Волчаночный нефрит как важнейший признак вызванной приста́ном СКВ удалось ингибировать при помощи лечения примерным соединением 12. Примерное соединение 12 немного превосходило иммунодепрессант циклофосфамид (50 мг/кг один раз в неделю п.о. с 0 дня), который был включен в эксперимент в качестве клинического контрольного вещества. Это представлено на фиг. 11 по оценке почечной патологии.

Модель in vivo вызванного посредством PLP₁₃₉₋₁₅₁ рецидивирующе-ремиттирующего ЭАЭ у мышей

Чтобы определить противовоспалительный потенциал соединений общей формулы (I), эти соединения оценивают на животной модели рецидивирующе-ремиттирующего РС в отношении их эффективности in vivo для терапевтического лечения острого эпизода РС или для предупреждения новых эпизодов. Модель рецидивирующе-ремиттирующего, вызванного при помощи PLP₁₃₉₋₁₅₁ (протеолипидный белок) ЭАЭ представляет собой стандартную модель на животных для тестирования фармакологических веществ для потенциального применения у пациентов с РС. Для запуска рецидивирующе-ремиттирующего ЭАЭ, в 0 день на четырех разных сторонах спины мыши (2 в верхней части шеи, 2 в нижней области приблизительно в 2 см от черепного основания хвоста), впрыскивают эмульсию, содержащую PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA (Hooke Kit™ PLP₁₃₉₋₁₅₁/CFA Emulsion; кат. № EK-0120; Hooke Laboratories, Lawrence MA, США) (0,05 мл/место инъекции) подкожно самкам мышей SJL (в возрасте 8-10 недель, Jackson Laboratories Bar Harbor, США). Здоровую контрольную группу ($n=5$ мышей), которую также тестируют, не иммунизируют. В дополнение к этой контрольной группе в эксперименте также тестируют контроль заболевания ЭАЭ. В ходе исследования обеим контрольным группам вводили лекарственную основу (этанол:арахисовое масло 10:90 об./об.) исследуемого вещества перорально. Ежедневное п.о. лечение различными дозами тестируемого вещества или его лекарственной основой осуществляют терапевтически в течение первого эпизода или после эпизода. В данном случае, терапевтическое лечение после появления ЭАЭ (первый эпизод; начало лечения 12-й день) служит для определения возможности лечения острого эпизода РС, тогда как терапевтическое лечение примерным соединением после первого эпизода (начало лечения 19-й день) предназначено выяснить, в какой степени испытуемое вещество может предотвратить новый эпизод. В этой модели ЭАЭ, вызванного посредством PLP₁₃₉₋₁₅₁, первые симптомы ЭАЭ появляются примерно на 11 день. Начиная с 9-го дня, клинические симптомы ЭАЭ оценивают ежедневно, вслепую, оценку осуществляют с использованием системы баллов (шкала; баллы от 0 = здоровый до 5 = умирающий), которая представляет собой серьезность расстройства (та же шкала оценивания, что и в модели MOG-EAE). В ходе исследования также контролируют массу тела и смертность.

Фиг. 1: Ингибирование IL-23 в образованных моноцитах ДК человека для примерного соединения 12. Данные представлены в виде средних значений со стандартными отклонениями.

Фиг. 2: Ингибирование 6-дневной дифференцировки Th17-клеток, измеренное путем выработки IL-17 после стимуляции (-CD4+ Т-клеток человека посредством анти-CD3/анти-CD28/rhIL-23/rhIL-6/rhIL-1beta/rhIL-2 (коктейль дифференцировки Th17 клеток), показанное примерным способом для примерного соединения 12 для 2 доноров (А, В). Данные представлены в виде средних значений со стандартными отклонениями.

Фиг. 3: Ингибирование INF- α в стимулированных (А) имиквимодом (R837, TLR7/8 лиганд)- или (В) CpG-A-(TLR9 лиганд) плазмацитоидных ДК человека для примерного соединения 12. Данные представлены в виде средних значений со стандартными отклонениями.

Фиг. 4: (А) Лечение вызванного посредством ЛПС воспаления при помощи примерного соединения

12 приводит к уменьшению количества секретируемых $\text{TNF}\alpha$ и IL-6 в плазме мышей. (В) Ингибирование $\text{TNF}\alpha$ примерным Соединением 11 и 12 в этом случае сопоставимо с клинически значимыми антагонистами ФНО [адалимумаб (Humira®), этанерцепт]. Данные представлены в виде средних значений со стандартными отклонениями. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим многократным сравнительным анализом с контрольной группой ЛПС с помощью теста Даннетта; $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$.

Фиг. 5: Противовоспалительные воздействия примерного соединения 11 в модели артрита на животных (индуцированная адьювантом крысиная модель). Значительное и зависящее от дозы ингибирование артритического воспаления суставов после (А) профилактического (с 0 дня) лечения в сравнении с клинически значимым сравнительным веществом этанерцепт и после (В) терапевтического лечения (>9-й день) измеряли с использованием шкал активности заболевания. (С) гистопатологический анализ суставов после профилактического лечения с помощью окрашивания гематоксилином/эозином подтвердил это, как и (D) процесс визуализации с помощью МРТ (магнитно-резонансная томография). (Е) кроме того, в ходе экспериментов наблюдали заметное ингибирование гипералгезии, измеренное посредством силы захвата мышей. Анализы ex vivo синовиальной жидкости (F) и артритических задних лап (G) показали значительное ингибирование концентрации цитокинов при лечении посредством примерного соединения 11. Данные соответствуют средним значениям + стандартные отклонения. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим многократным сравнительным анализом с контрольной группой CFA с помощью теста Даннетта; $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$.

Сокращения:

Фиг. (А) и (В). "Шкала" означает шкалу активности заболевания; "дни" означает дни после вызывания артрита; Этанерц. - этанерцепт; ctrl. - здоровый контроль; CFA ctrl. - контроль артрита.

Фиг. С. "Шкала" означает "Гистопатологический показатель".

Фиг. D:

I = ctrl. (здоровый контроль)

II = CFA ctrl. (контроль артрита)

III = CFA + 200 мг/кг#11 (лечение ингибитором IRAK4 пример 11)

Фиг. E: "%" означает силу захвата; "дни" означает дни после вызывания артрита.

Фиг. 6: Противовоспалительные воздействия примерного соединения 12 в животной модели артрита (мышинная модель, индуцированная коллагеновыми антителами, CAIA). Значительное и зависящее от дозы ингибирование артритического воспаления суставов после профилактического (0 день) (А) и терапевтического лечения (>9 дней) (В) измеряли с использованием Шкал Активности Заболевания. (С) гистопатологический анализ артритических суставов с помощью окрашивания гематоксилином/эозином подтвердил противовоспалительную активность после терапевтического лечения. Ингибирование артрита примерным соединением 12. Данные соответствуют средним значениям + стандартные отклонения. Статистические значения между коллагеновым антителом (АК) контроль и терапевтическими группами подсчитывали при помощи однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим многократным сравнительным анализом (тест Даннетта) ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$).

Сокращения: фиг. (А) и (В) "Шкала" означает шкалу активности заболевания; "дни" означает дни после вызывания артрита; ctrl. - здоровый контроль; CAIA - контроль артрита.

Фиг. С "Шкала" означает "гистопатологический показатель".

Фиг. 7: Противовоспалительное действие примерного соединения 12 в животной модели рассеянного склероза (мышинной модели вызванного посредством MOG₃₃₋₃₅ ЭАЭ) в сравнении с терифлуномидом и преднизолоном. Значительное и зависящее от дозы ингибирование клинической тяжести расстройства (шкала активности заболевания ЭАЭ) (А), показателя частоты заболеваний (В) и гистопатологического повреждения спинного мозга (С), оцененного по нейроаксиальной дегенерации (дегенерация, нейроаксонал, белое вещество) и инфильтрация лимфоцитов в белое вещество (инфильтрат, лимфогистиоцит, белое вещество) или в серое вещество (кора; инфильтрат, лимфогистиоцит, серое вещество) после лечения соединением 12. Данные соответствуют средним значениям + стандартные отклонения. Статистические значения между MOG-ЭАЭ контролем и терапевтическими группами подсчитывали при помощи однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим многократным сравнительным анализом (тест Даннетта) ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$).

Сокращения: фиг. А "Шкала" означает шкалу активности заболевания ЭАЭ; "дни" означает дни после вызывания ЭАЭ; ctrl. - здоровый контроль; MOG-ЭАЭ-контроль ЭАЭ фиг. В "%" означает распространенность заболевания ЭАЭ; "дни" означает дни после вызывания ЭАЭ. Фиг. С "Шкала" означает гистопатологический показатель по отношению к нейроаксональной дегенерации в белом веществе. Фиг. D "Шкала" означает гистопатологическую шкалу по отношению к лимфогистиоцитарным инфильтратам в белом веществе. Фиг. E "Шкала" означает гистопатологический показатель по лимфогистиоцитарным инфильтратам в сером веществе.

Фиг. 8: Противовоспалительное действие примерного соединения 12 в животной модели псориаза (вызванная IMQ мышинная модель). Значительное подавление клинической оценки (А), которая включает

клинические симптомы эритемы, шелушения и толщины кожи на спине и гистопатологической оценки ушей (В) или кожи спины (С), которая оценивает патологические параметры паракератоза, воспаления и экзотоза. Данные соответствуют средним значениям + стандартные отклонения. Статистические значения между IMQ контроль и терапевтическими группами подсчитывали при помощи однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим многократным сравнительным анализом (тест Даннетта) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). Сокращения: Этанерц. - этанерцепт; Бетамет - бетаметазон; по - перорально; ип - внутривенная инъекция; bid - два раза в сутки; q2d - через день.

Фиг. 9: Противовоспалительные воздействия примерного соединения 12 в животной модели TH1-опосредованного воспаления кожи (модель вызванного посредством DNFB воспаления кожи у мышей). Значительное и зависящее от дозы ингибирование воспаления кожи, о чем свидетельствует вес уха (в мг), что коррелирует с образованием отека во время воспаления. Статистические значения между DNFB-контролем и терапевтическими группами подсчитывали при помощи однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим многократным сравнительным анализом (тест Даннетта) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). Сокращения: "мг" на оси у означает массу уха; Ctrl - здоровый контроль; раздражитель-контроль раздражения.

Фиг. 10: Противовоспалительные воздействия примерного соединения 12 в животной модели TH2-опосредованного воспаления кожи (модель у мышей вызванного посредством TMA воспаления кожи). Ингибирование воспаления кожи показано как увеличение толщины уха (дельта [дельта] толщина уха в мм) по сравнению с исходным уровнем. Увеличение толщины уха рассматривают как меру воспаления, и представляет собой образование отека в ткани уха во время воспалительной реакции. Сокращения: "мм" на оси у означает изменение (дельта) в весе уха; ctrl - здоровый контроль.

Фиг. 11: Противовоспалительное воздействие примерного соединения 12 в животной модели системной красной волчанки (вызванная пристаном модель у мышей). Значительное ингибирование повреждения почек показано при помощи гистопатологических оценок почек. Данные соответствуют средним значениям + стандартные отклонения. Статистические значения между СКВ контролем и терапевтическими группами подсчитывали при помощи однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим многократным сравнительным анализом (тест Даннетта) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). Сокращения: "Шкала" означает оценку почечной гистопатологии; IRAK4i означает ингибитор IRAK4, в данном случае примерное соединение 11; CPA - циклофосфамид; ctrl. - здоровый контроль; 2x - два раза в сутки.

Фиг. 12: Противовоспалительное воздействие примерного соединения 12 в животной модели IBD (Воспалительное заболевание кишечника) (вызванный посредством DSS колит у мышей). Значительное ингибирование воспаления кишечника, включая образование язвы, определенное эндоскопией на 16 день. Эндоскопическая оценка была сделана с помощью системы оценки в отношении тяжести и степени воспаления толстой кишки. Данные соответствуют средним значениям + стандартные отклонения. Статистические значения между DSS контролем и терапевтическими группами подсчитывали при помощи однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим многократным сравнительным анализом (тест Даннетта) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). Сокращения: "шкала" означает эндоскопическую шкалу; α IL-12p40 - антимышиное IL-12p40 моноклональное антитело; IRAK4i означает ингибитор IRAK4, в данном случае примерное соединение 11; BID - два раза в сутки; Q3D - каждый третий день.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение соединения, выбранного из:

11) N-[2-(3-гидрокси-3-метилбутил)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2Н-индазол-5-ил]-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида или

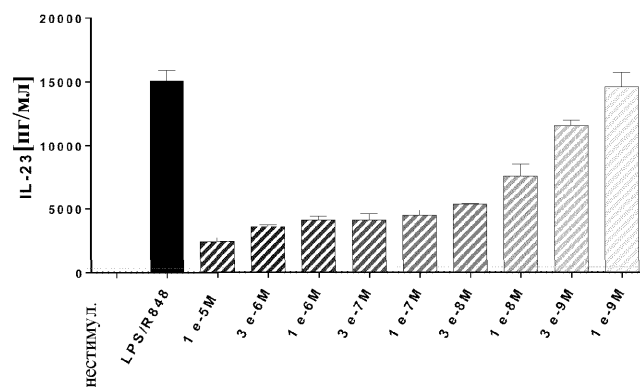
12) N-{6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2-[2-(метилсульфонил)этил]-2Н-индазол-5-ил}-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксамида,

для приготовления лекарственного средства для лечения и/или профилактики опосредованного IRAK4 нарушения, выбранного из рассеянного склероза, аллергического контактного дерматита и аллергической экземы.

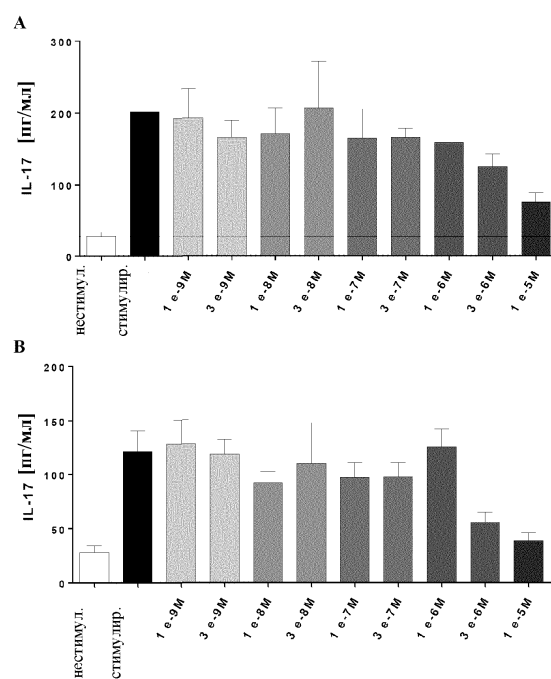
2. Применение по п.1, где указанное лечение и/или профилактика включает лечение и/или профилактику боли, связанной с указанным нарушением.

3. Применение по п.2, где указанная боль включает острую, хроническую, воспалительную и/или невропатическую боль.

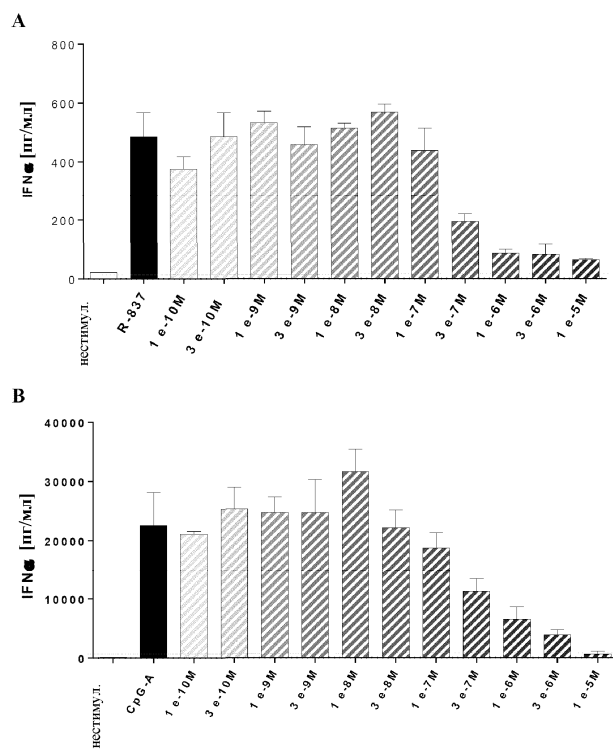
4. Применение по п.3, где указанная боль представляет собой гипералгезию, аллодинию или боль в пояснице.



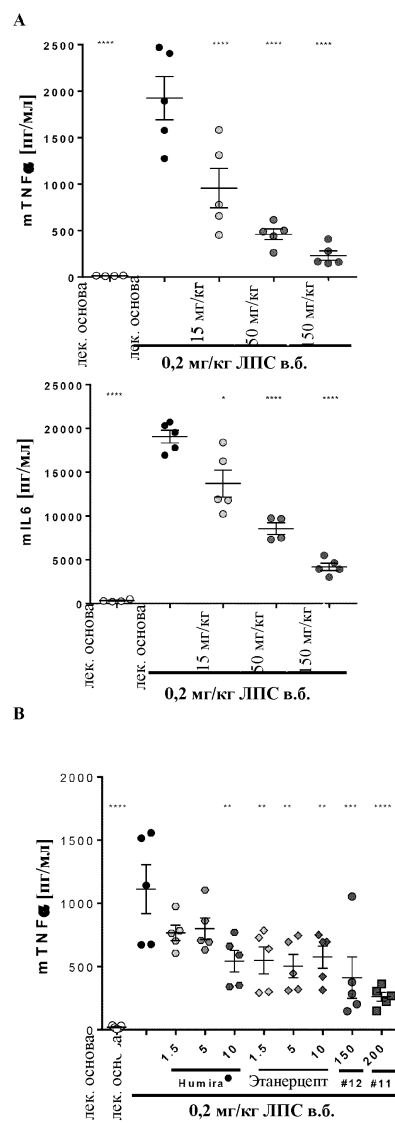
Фиг. 1



Фиг. 2

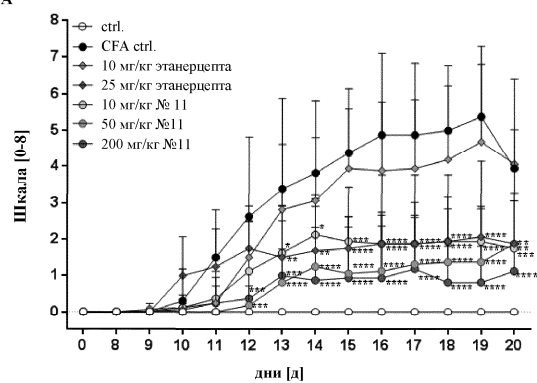


Фиг. 3

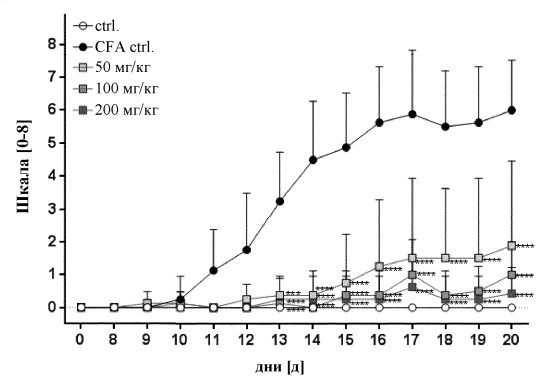


Фиг. 4

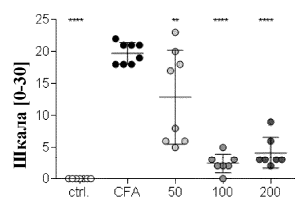
A



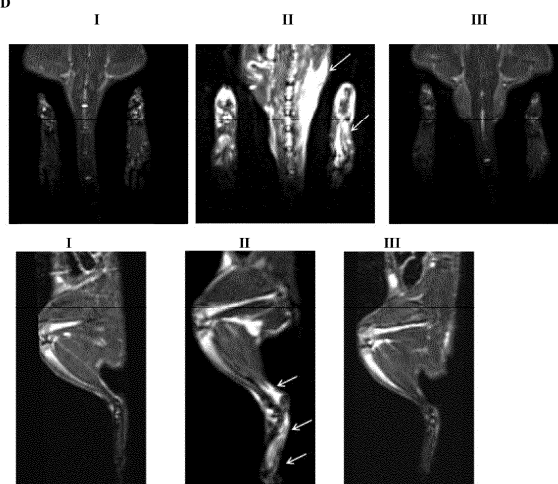
B

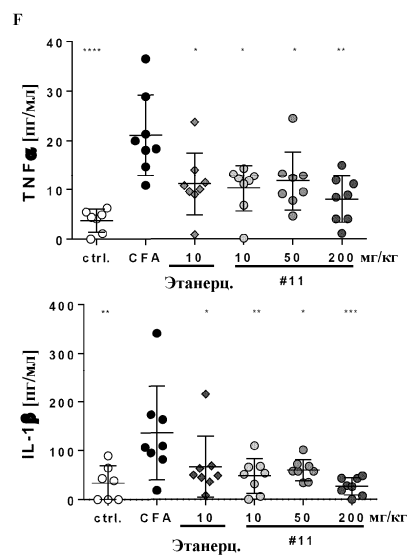
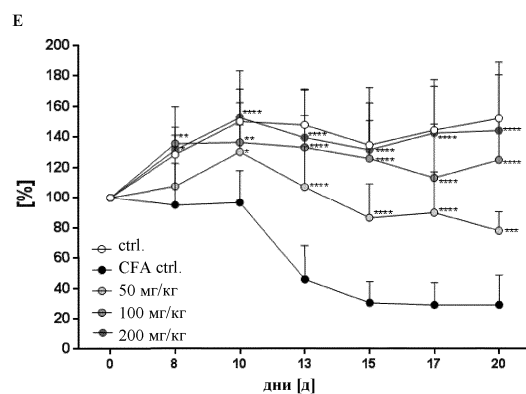


C

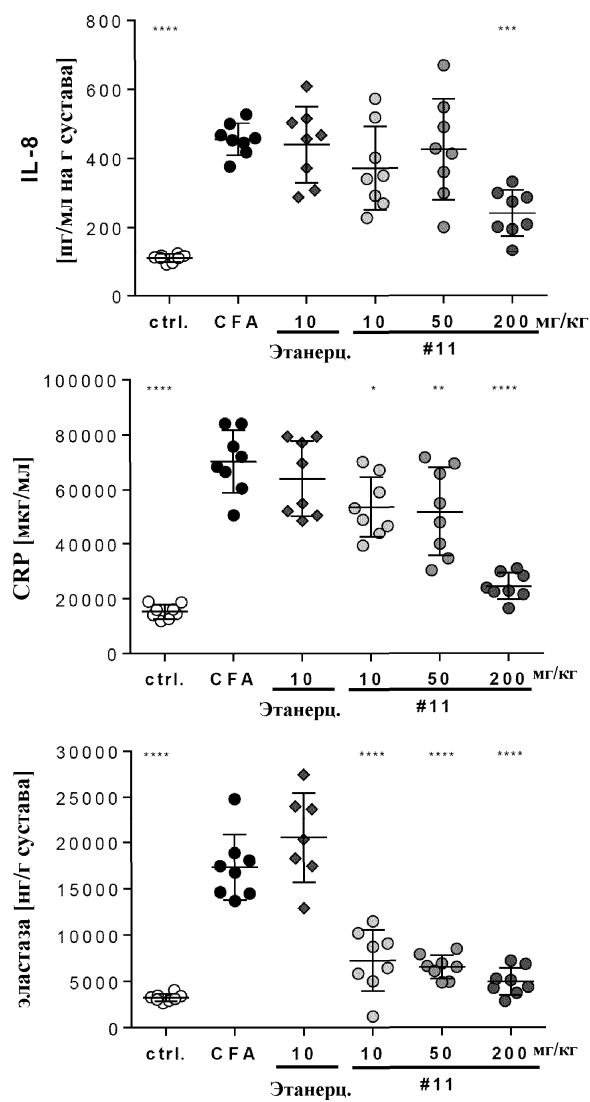


D

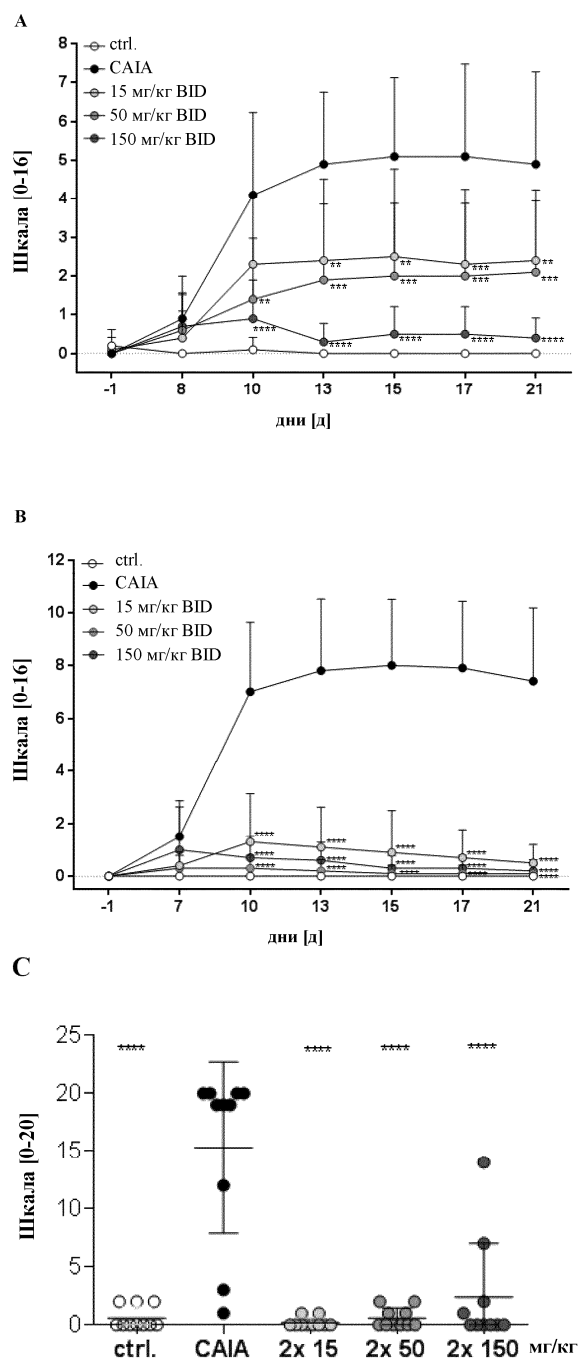




G

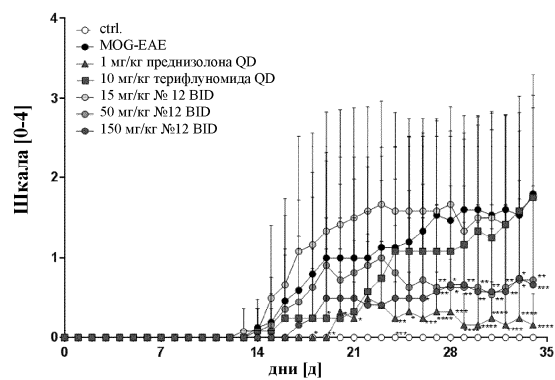


Фиг. 5

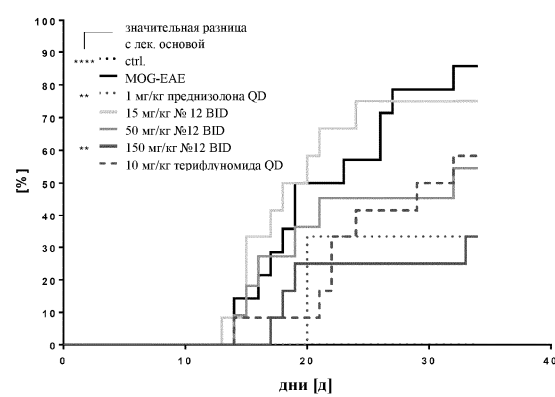


Фиг. 6

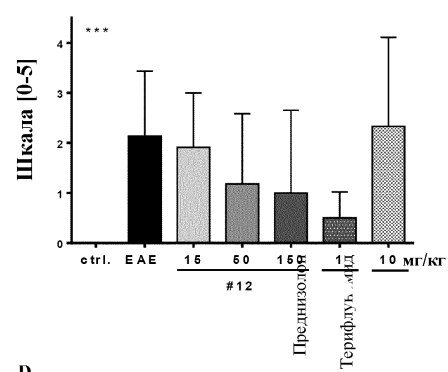
А



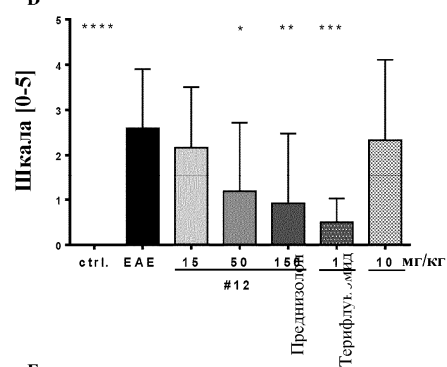
В



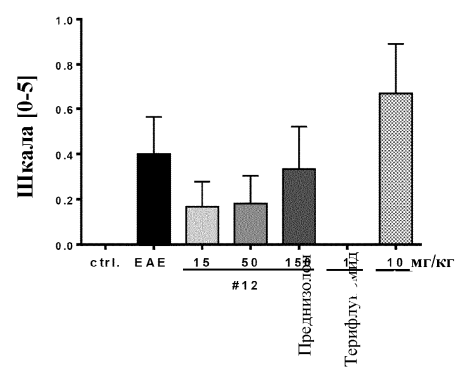
C



D

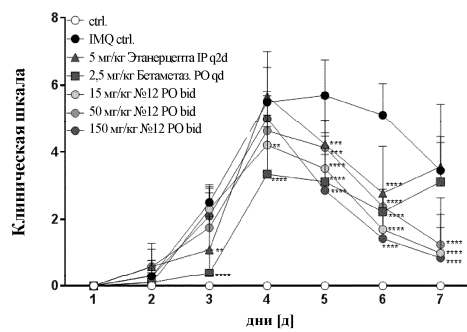


E

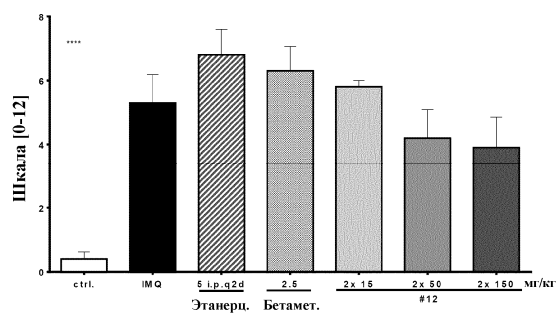


Фиг. 7

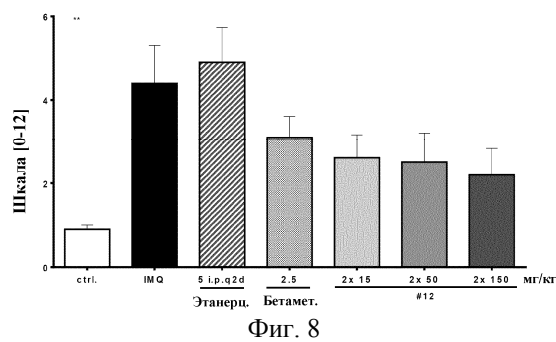
A



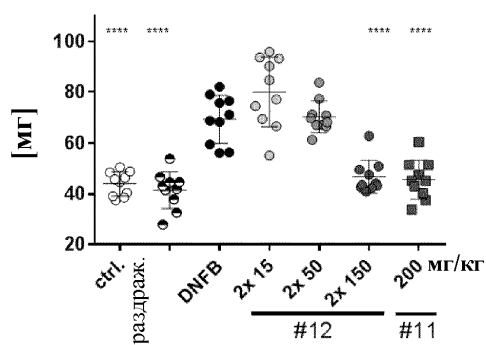
B



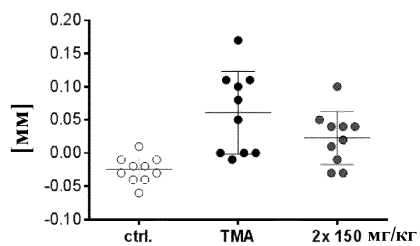
C



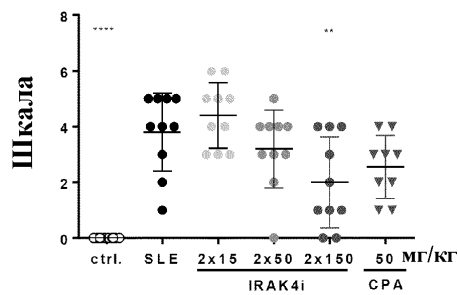
Фиг. 8



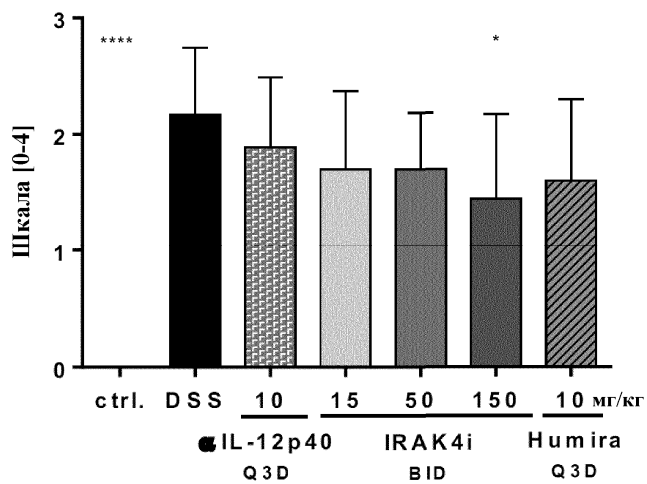
Фиг. 9



Фиг. 10



ФИГ. 11



ФИГ. 12