

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **041115**(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.09.15**

**(21)** Номер заявки  
**202091016**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.10.26**

**(51)** Int. Cl. **C07D 451/14** (2006.01)  
**C07D 451/04** (2006.01)  
**C07D 403/12** (2006.01)  
**A61K 31/519** (2006.01)

**(54) ПИРИМИДИНОВОЕ СОЕДИНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРА JAK КИНАЗЫ**

**(31)** 62/577,852

**(32)** 2017.10.27

**(33)** US

**(43)** 2020.07.17

**(86)** PCT/US2018/057682

**(87)** WO 2019/084383 2019.05.02

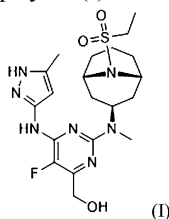
**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ТЕРЕВАНС БАЙОФАРМА Ар энд Ди  
АйПи, ЭлЭлСи (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Козак Дженифер, Хадсон Райан,  
Брандт Гари И.Л., Маккиннелл  
Роберт Мюррей, Дэброс Марта,  
Нзерем Джерри (US)**

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

**(56)** WO-A1-2016191524  
US-A1-2016052930  
WO-A1-2015094803

**(57)** Изобретение относится к соединению формулы (I)



или его фармацевтически приемлемой соли, которое представляет собой ингибитор JAK киназ. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим такое соединение, кристаллической форме, способам применения такого соединения для лечения воспалительных кожных заболеваний и других заболеваний и к способам и промежуточным соединениям, применимым для получения такого соединения.

**041115 B1**

**041115 B1**

### Предпосылки создания изобретения

#### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к пиримидиновому соединению, применимому в качестве ингибитора JAK киназы. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим такое соединение, кристаллическим формам таких соединений, способам применения такого соединения для лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний и способам и промежуточным соединениям, применимым для получения такого соединения.

#### Существующий уровень техники

Ингибирование ферментов семейства JAK может ингибировать передачу сигналов многих ключевых провоспалительных цитокинов. Таким образом, ингибиторы JAK, по всей видимости, применимы при лечении atopического дерматита и других воспалительных кожных заболеваний, аллергического ринита, астмы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и других воспалительных заболеваний легких, язвенного колита и других воспалительных желудочно-кишечных заболеваний, а также глазных воспалительных заболеваний.

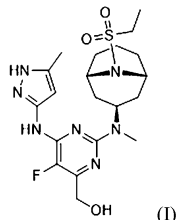
Атопический дерматит (AD) представляет собой распространенное хроническое воспалительное кожное заболевание, которым только в Соединенных Штатах Америки поражено примерно 14 млн человек. По оценкам AD поражено 10-20% детей и 1-3% взрослых в развитых странах (Bao et al., JAK STAT, 2013, 2, e24137), и его распространенность возрастает. С AD связывают повышение содержания провоспалительных цитокинов, которые зависят от сигнального пути JAK-STAT, в частности IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IFN $\gamma$  и TSLP (Bao et al., Leung et al., The Journal of Clinical Investigation, 2004, 113, 651-657). Кроме того, было показано, что повышенная регуляция IL-31, другого цитокина, который передает сигналы посредством димеризации JAK, связано с зудом, ассоциированным с хроническим AD (Sonkoly et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2006, 117, 411-417).

По причине модулирующего эффекта сигнального пути JAK/STAT на иммунную систему, системное воздействие ингибиторами JAK может характеризоваться побочным системным иммуносупрессирующим эффектом. Поэтому, было бы желательно предоставить новый ингибитор JAK, которые оказывает свой эффект в месте приложения действия без значительных системных эффектов. В частности, для лечения воспалительных кожных заболеваний, таких как atopический дерматит, было бы желательно предоставить новый ингибитор JAK, который можно вводить местно и обеспечивать терапевтически значимое воздействие на кожу и который легко удаляется для минимизации системного воздействия.

#### Сущность изобретения

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к соединению, характеризующемуся активностью в качестве ингибитора JAK киназы.

Соответственно настоящее изобретение относится к соединению формулы (I)



или его фармацевтически приемлемой соли.

Настоящее изобретение также относится к кристаллической форме соединения (I).

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение (I) и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения у млекопитающего воспалительных и аутоиммунных заболеваний кожи, в частности atopического дерматита и гнездной алопеции, причем способ включает в себя введение млекопитающему соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли.

Настоящее изобретение также относится к способам синтеза и промежуточным соединениям, описанным в настоящем документе, которые применимы для получения соединения (I).

Настоящее изобретение также относится к соединению (I), описанному в настоящем документе, для применения при лечении воспалительных заболеваний или нарушений.

#### Краткое описание чертежей

Различные аспекты настоящего изобретения проиллюстрированы посредством ссылки на прилагаемые чертежи.

На фиг. 1 представлена порошковая рентгеновская дифрактограмма (PXRD) кристаллической формы I соединения (I) (здесь и далее в тексте, формы I).

На фиг. 2 представлена термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) для кристаллической формы I.

На фиг. 3 представлен кривая термogrавиметрического анализа (TGA) кристаллической формы I.

На фиг. 4 представлена изотерма динамической сорбции влаги для кристаллической формы I.

На фиг. 5 представлена порошковая рентгеновская дифрактограмма (PXRD) кристаллической формы II соединения (I) (здесь и далее в тексте, формы II).

На фиг. 6 представлена термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) для кристаллической формы II.

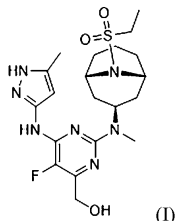
На фиг. 7 представлена кривая термогравиметрического анализа (TGA) кристаллической формы II.

На фиг. 8 представлена изотерма динамической сорбции влаги для кристаллической формы II.

### Подробное описание изобретения

В числе других аспектов, настоящее изобретение относится к ингибитору киназы JAK формулы (I), его фармацевтически приемлемым солям и промежуточным соединениям для его получения.

Химические структуры в настоящем документе поименованы в соответствии номенклатурой IUPAC, реализованной в программном обеспечении ChemDraw (PerkinElmer, Inc., Cambridge, MA). Например, соединение (I)



называется (2-(((1R,3s,5S)-9-(этилсульфонил)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)(метил)амино)-5-фтор-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-4-ил)метанол.

Символьное обозначение (1R,3s,5S) описывает экзоориентацию пиримидиниламиногруппы относительно 9-азабицикло[3.3.1]нонановой группы.

Кроме того, пиразолильный фрагмент соединения (I), а также других соединений, раскрытых в настоящем документе, существует в таутомерной форме. Следует понимать, что хотя строго определенные структуры представлены и поименованы в конкретной форме, настоящее изобретение также включает в себя их таутомеры.

Соединения согласно настоящему раскрытию содержат один или несколько хиральных центров, а потому такие соединения (и их промежуточные соединения) могут существовать в виде рацемических смесей; чистых стереоизомеров (т.е. энантиомеров или диастереоизомеров); стереоизомер-обогащенных смесей и т.п. Если не указано иное, то предполагается, что хиральные соединения, представленные или поименованные в настоящем документе без определенной стереохимии по хиральному центру, включают в себя абсолютно все возможные стереоизомерные варианты по стереоцентру, который не определен. Если не указано иное, то изображение или наименование конкретного стереоизомера означает, что указанный стереоцентр характеризуется указанной стереохимией с пониманием того, что малые количества других стереоизомеров также могут присутствовать при условии, что применимость изображенного или поименованного соединения не исключается присутствием другого стереоизомера.

Соединение формулы (I) может существовать в виде свободного основания или в различных солевых формах, таких как монопротонированная солевая форма, дипротонированная солевая форма, трипротонированная солевая форма или их смеси. Если не указано иное, то все указанные формы включены в объем настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также включает в себя меченные изотопами версии соединений согласно настоящему раскрытию, включая соединение формулы (I), где некоторый атом заменен или обогащен атомом, имеющим тот же атомный номер, но атомная масса которого отличается от атомной массы, преобладающей в природе. Примеры изотопов, которые могут быть введены в соединение формулы (I), включают без ограничения  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{35}\text{S}$  и  $^{18}\text{F}$ . Особый интерес представляют соединения формулы (I), обогащенные тритием или углеродом-14, которые могут быть использованы, например, для исследований по распределению препаратов в тканях. Кроме того, особый интерес представляют соединения формулы (I), обогащенные дейтерием, в особенности в важных для обмена веществ местах, и как предполагается, указанные соединения обладают большей метаболической стабильностью. Кроме того, особый интерес представляют соединения формулы (I), обогащенные дейтерием, особенно в местах метаболизма, которые, как предполагается, обладают большей метаболической стабильностью. Кроме того, особый интерес представляют соединения формулы (I), обогащенные позитрон-испускающими изотопами, такими как  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{15}\text{O}$  и  $^{13}\text{N}$ , которые могут быть использованы, например, для исследований методом позитронно-эмиссионной томографии (PET).

### Определения

Если не указано иное, то при описании настоящего изобретения, включая его различные аспекты и варианты осуществления, следующие термины имеют следующие значения.

Термин "алкил" означает одновалентную насыщенную углеводородную группу, которая может быть неразветвленной или разветвленной, или представлять собой их комбинацию. Если не указано

иное, то указанные алкильные группы обычно содержат от 1 до 10 атомов углерода. Иллюстративные алкильные группы включают в себя, в качестве примера, метил (Me), этил (Et), н-пропил (n-Pr) или (nPr), изопропил (i-Pr) или (iPr), н-бутил (n-Bu) или (nBu), вторбутил, изобутил, трет-бутил (t-Bu) или (tBu), н-пентил, н-гексил, 2,2-диметилпропил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, 2-этилбутил, 2,2-диметилпентил, 2-пропилпентил и т.п.

В том случае, если для конкретного термина указано определенное число атомов углерода, то число атомов углерода показано предшествующим термину. Например, термин "C<sub>1-3</sub>алкил" означает алкильную группу, содержащую от 1 до 3 атомов углерода, где атомы углерода находятся в любой химически приемлемой конфигурации, включая неразветвленную или разветвленную конфигурации.

Термин "алкокси" означает одновалентную группу -О-алкил, где значение алкила определено выше. Иллюстративные алкоксигруппы включают в себя, в качестве примера, метокси, этокси, пропокси, бутокси и т.п.

Термин "циклоалкил" означает одновалентную насыщенную карбоциклическую группу, которая может быть моноциклической или полициклической. Если не указано иное, то указанные циклоалкильные группы обычно содержат от 3 до 10 атомов углерода. Иллюстративные циклоалкильные группы включают в себя, в качестве примера, циклопропил (cPr), циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил, циклооктил, адамантил и т.п.

Термин "галоген" означает фтор, хлор, бром или йод.

Термин "гетероцикл", "гетероцикл", "гетероциклический" или "гетероциклическое кольцо" означает одновалентную насыщенную или частично ненасыщенную циклическую неароматическую группу, содержащую всего от 3 до 10 кольцевых атомов, где кольцо содержит от 2 до 9 кольцевых атомов углерода и от 1 до 4 кольцевых гетероатомов, выбранных из атома азота, кислорода и серы. Гетероциклические группы могут быть моноциклическими или полициклическими (например, конденсированными или соединенными мостиковыми связями). Иллюстративные гетероциклические группы включают, в качестве примера, пирролидинил, пиперидинил, пиперазинил, имидазолидинил, морфолинил, тиоморфолинил, индолин-3-ил, 2-имидазолинил, тетрагидропиранил, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-2-ил, хинуклидинил, 7-азанорборнанил, нортропанил и т.п., где местом присоединения является любой доступный кольцевой атом углерода или азота. Если точка присоединения гетероциклической группы очевидна из контекста, то в качестве альтернативы такие группы могут называться невалентными фрагментами, такими как пирролидин, пиперидин, пиперазин, имидазол, тетрагидропиран и т.п.

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

Используемый в настоящем документе термин "лечение" означает лечение заболевания, нарушения или медицинского состояния у пациента (например, воспалительного желудочно-кишечного заболевания), такого как млекопитающее (в частности, человек), которое включает в себя одно или несколько из следующего:

(a) профилактику возникновения заболевания, нарушения или медицинского состояния, т.е. профилактику повторного появления заболевания или медицинского состояния, или профилактическое лечение пациента, который предрасположен к заболеванию или медицинскому состоянию;

(b) снижение интенсивности симптомов заболевания, нарушения или медицинского состояния, т.е. устранение или индукцию регрессии заболевания, нарушения или медицинского состояния у пациента, включая нейтрализацию эффектов других терапевтических средств;

(c) подавление заболевания, нарушения или медицинского состояния, т.е., замедление или остановку развития заболевания, нарушения или медицинского состояния у пациента; или

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

Термин "фармацевтически приемлемая соль" означает соль, которая является приемлемой для введения пациенту или млекопитающему, такому как человек (например, соли, характеризующиеся приемлемой безопасностью для млекопитающих в заданном режиме дозирования). Иллюстративные фармацевтически приемлемые соли включают в себя соли уксусной, аскорбиновой, бензолсульфоновой, бензойной, камфорсульфоновой, лимонной, этансульфоновой, 1,2-этандисульфоновой, фумаровой, гентизиновой, глюконовой, глюкуроновой, глутаминовой, гипсуровой, бромистоводородной, соляной, изетионовой, молочной, лактобионовой, малеиновой, яблочной, миндальной, метансульфоновой, слизиной, нафталинсульфоновой, нафталин-1,5-дисульфоновой, нафталин-2,6-дисульфоновой, никотиновой, азотной, оротовой, памовой, пантотеновой, фосфорной, янтарной, серной, винной, пара-толуолсульфоновой и ксинафоевой кислоты и т.п.

Термин "его соль" означает соединение, которое формируется, когда атом водорода кислоты заменяется катионом, таким как катион металла или органический катион, и т.п. Например, катион может представлять собой протонированную форму соединения формулы (I), т.е. форму, в которой одна или несколько аминогрупп были протонированы кислотой. Обычно соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль, однако это не обязательно для солей промежуточных соединений, которые не предназначены для введения пациенту.

Термин "аминозащитная группа" означает защитную группу, пригодную для предотвращения не-

желательных реакций атома азота аминогруппы. Иллюстративные аминозащитные группы включают в себя без ограничения формил; ацильные группы, например, алканоильные группы, такие как ацетил и трифторацетил; алкоксикарбонильные группы, такие как трет-бутоксикарбонил (Boc); арилметоксикарбонильные группы, такие как бензилоксикарбонил (Cbz) и 9-флуоренилметоксикарбонил (Fmoc); арилметильные группы, такие как бензил (Bn), тритил (Tr) и 1,1-ди-(4'-метоксифенил)метил; силильные группы, такие как триметилсилил (TMS), триизопропилсилил (TIPS), трет-бутилдиметилсилил (TBS или TBDMS), [2-(триметилсилил)этокси]метил (SEM) и т.п. Многочисленные защитные группы, а также их введение и удаление описаны в документе T.W. Greene and G.M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Third Edition, Wiley, New York.

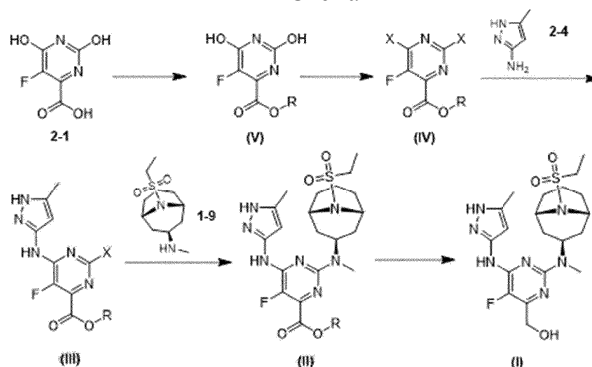
#### Общие методики синтеза

Соединение (I) и его промежуточные соединения могут быть получены в соответствии со следующими общими способами и методиками с использованием коммерчески доступных или легко получаемых исходных веществ и реагентов. Если не указано иное, то заместители и переменные (например, R и X), используемые в последующих схемах, имеют те же значения, что и значения, указанные по тексту настоящего документа. Кроме того, если не указано иное, то соединения, имеющие кислый или основной атом или функциональную группу, могут быть использованы или могут быть получены в виде соли (в некоторых случаях перед проведением реакции использование соли в конкретной реакции потребует преобразование соли в несольевую форму, например в форму свободного основания, с помощью стандартных процедур).

Хотя в последующих методиках может быть представлен или описан конкретный вариант осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что другие варианты осуществления или аспекты настоящего изобретения также могут быть реализованы с помощью указанных методик или с помощью других методов, реагентов и исходных веществ, известных специалистам в данной области техники. В частности, следует понимать, что соединение (I) может быть получено целым рядом технологических способов, в которых реагенты объединяют в различном порядке для предоставления различным промежуточным соединениям пути, необходимого для получения конечного продукта.

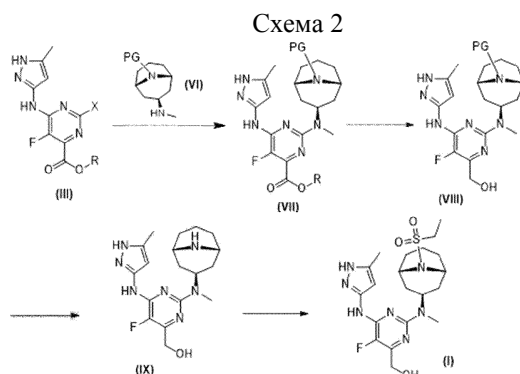
Общие способы получения соединения (I) проиллюстрированы на схемах 1 и 2.

Схема 1



Исходное вещество 2-1 может быть преобразовано до сложного эфира (V) путем осуществления взаимодействия со спиртом в присутствии кислоты, где R представляет собой алкильную группу. Согласно некоторым вариантам осуществления R представляет собой C<sub>1-12</sub>алкильную группу. Согласно некоторым вариантам осуществления спирт представляет собой этанол. Соединение (V) может быть преобразовано до дигалогенсодержащего соединения (IV). Согласно некоторым вариантам осуществления, соединение (IV) представляет собой дихлорсодержащий аналог. Согласно некоторым вариантам осуществления реагент представляет собой POCl<sub>3</sub>. Соединение (IV) может быть преобразовано до соединения (III) путем осуществления взаимодействия с соединением 2-4 в присутствии основания. Соединение (II) может быть получено путем осуществления взаимодействия соединения (III) с соединением 1-9 в присутствии основания. В завершение, соединение (II) может быть восстановлено до соединения (I) в присутствии восстановителя. Согласно некоторым вариантам осуществления восстановитель представляет собой источник гидрида лития или натрия. Согласно некоторым вариантам осуществления восстановитель представляет собой LiAlH<sub>4</sub>, NaBH<sub>4</sub> или LiBH<sub>4</sub>. Согласно некоторым вариантам осуществления R представляет собой этил. Необязательно может быть получена фармацевтически приемлемая соль соединения (I).

Для данного общего способа согласно некоторым вариантам осуществления R представляет собой C<sub>1-12</sub>алкил. Согласно некоторым вариантам осуществления R представляет собой C<sub>1-6</sub>алкил. Согласно некоторым вариантам осуществления R представляет собой C<sub>1-3</sub>алкил. Согласно некоторым вариантам осуществления R представляет собой этил. Согласно некоторым вариантам осуществления X представляет собой F, Cl или Br. Согласно некоторым вариантам осуществления X представляет собой Cl. Согласно некоторым вариантам осуществления R представляет собой этил и X представляет собой Cl.

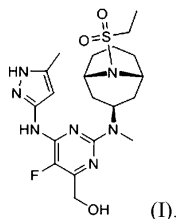


В качестве альтернативы, может быть осуществлено взаимодействие соединения (III) с соединением (VI), где PG представляет собой аминозащитную группу, в присутствии основания, такого как DIPEA, с получением соединения (VII). Соединение (VII) может быть восстановлено до соответствующего спирта (VIII) восстановителем. Согласно некоторым вариантам осуществления восстановитель представляет собой источник гидрида лития или натрия. Согласно некоторым вариантам осуществления восстановитель представляет собой  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{NaBH}_4$  или  $\text{LiBH}_4$ . С соединения (VIII) может быть снята защита с получением соединения (IX). Если PG представляет собой Boc, то снятие защиты может проводиться в присутствии сильной кислоты, такой как TFA или HCl. В завершение, может быть осуществлено взаимодействие соединения (IX) с источником этансульфоната, таким как этансульфонилхлорид.

Для данного общего способа согласно некоторым вариантам осуществления PG представляет собой трет-бутоксикарбонил (Boc). Согласно некоторым вариантам осуществления R представляет собой  $\text{C}_{1-12}$ алкил. Согласно некоторым вариантам осуществления R представляет собой  $\text{C}_{1-6}$ алкил. Согласно некоторым вариантам осуществления R представляет собой  $\text{C}_{1-3}$ алкил. Согласно некоторым вариантам осуществления R представляет собой этил. Согласно некоторым вариантам осуществления X представляет собой F, Cl или Br. Согласно некоторым вариантам осуществления X представляет собой Cl. Согласно некоторым вариантам осуществления R представляет собой этил и X представляет собой Cl.

#### Кристаллическая форма I

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к кристаллической форме (форме I) соединения (I)



Согласно одному аспекту, кристаллическая форма характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, содержащей дифракционные пики при значениях  $2\theta$ , равных  $11,19 \pm 0,20$ ,  $11,73 \pm 0,20$ ,  $18,80 \pm 0,20$  и  $19,29 \pm 0,20$ . Согласно одному аспекту, кристаллическая форма дополнительно характеризуется дополнительными дифракционными пиками при значении  $2\theta$ , равном  $6,75 \pm 0,20$ . Согласно одному аспекту, кристаллическая форма дополнительно характеризуется двумя или более дополнительными дифракционными пиками при значениях  $2\theta$ , выбранных из  $5,91 \pm 0,20$ ,  $6,28 \pm 0,20$ ,  $8,08 \pm 0,20$ ,  $16,68 \pm 0,20$ ,  $17,62 \pm 0,20$ ,  $20,53 \pm 0,20$  и  $22,16 \pm 0,20$ .

Как хорошо известно в области порошковой рентгеновской дифрактометрии, положения пиков в порошковых рентгеновских дифрактограммах относительно менее чувствительны к деталям проведения эксперимента, таким как детали приготовления образца и геометрия прибора, чем величины относительной высоты пиков. Поэтому, согласно одному аспекту, кристаллическая форма I характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, в которой положения пиков по существу соответствуют положениям пиков, представленным на фиг. 1.

Согласно одному аспекту, кристаллическую форму I характеризуют по ее поведению в результате воздействия высокой температурой. Как представлено на фиг. 2, кривая дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), записанная при скорости нагревания  $10^\circ\text{C}$  в минуту, характеризуется пиком эндотермического теплового потока, отождествляемого с переходом в расплав, с максимумом эндотермического теплового потока при температуре  $250,9^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . Согласно другому аспекту форма I характеризуется кривой дифференциальной сканирующей калориметрии, по существу соответствующей кривой, представленной на фиг. 2.

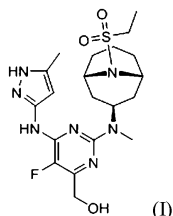
На кривой термогравиметрического анализа (TGA) на фиг. 3 продемонстрирована потеря массы приблизительно на 0,70% между  $22$  и  $125^\circ\text{C}$  при продувке  $\text{N}_2$ . Соединение разлагается с температурой начала разложения приблизительно при  $250^\circ\text{C}$ .

Как описано в получении 2, форма I может быть получена путем растворения соединения (I) в этаноле при нагревании. Полученный раствор затем охлаждают приблизительно до 25°C. Форма I может быть выделена путем фильтрования.

Согласно одному аспекту, настоящее изобретение относится к способу получения кристаллической формы I, причем способ включает в себя: (а) растворение соединения (I) в растворителе, таком как этанол, с необязательным применением нагревания с формированием реакционной смеси; (б) охлаждение раствора приблизительно до 25°C с необязательным перемешиванием; и (с) выделение кристаллической формы I из реакционной смеси, например, путем фильтрования.

### Кристаллическая форма II

Согласно одному аспекту, настоящее раскрытие относится к кристаллической форме (форме II) соединения (I)



которая представляет собой безводную кристаллическую форму свободного основания.

Согласно одному аспекту, кристаллическая форма характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, содержащей дифракционные пики при значениях  $2\theta$ , равных  $11,4\pm 0,2$ ,  $16,2\pm 0,2$ ,  $16,6\pm 0,2$ ,  $17,7\pm 0,2$  и  $21,9\pm 0,2$ .

Согласно одному аспекту, кристаллическая форма дополнительно характеризуется дополнительными дифракционными пиками при значениях  $2\theta$ , равных  $8,9\pm 0,2$ ,  $9,5\pm 0,2$  и  $10,2\pm 0,2$ .

Согласно одному аспекту, кристаллическая форма дополнительно характеризуется двумя или более дополнительными дифракционными пиками при значениях  $2\theta$ , выбранных из  $14,4\pm 0,2$ ,  $19,0\pm 0,2$ ,  $19,2\pm 0,2$ ,  $19,8\pm 0,2$ ,  $20,1\pm 0,2$ ,  $20,4\pm 0,2$ ,  $20,6\pm 0,2$ ,  $20,8\pm 0,2$ ,  $21,3\pm 0,2$ ,  $25,9\pm 0,2$ ,  $30,1\pm 0,2$ ,  $30,5\pm 0,2$ ,  $30,9\pm 0,2$ ,  $32,6\pm 0,2$  и  $33,8\pm 0,2$ .

Как хорошо известно в области порошковой рентгеновской дифрактометрии, положения пиков в порошковых рентгеновских дифрактограммах относительно менее чувствительны к деталям проведения эксперимента, таким как детали приготовления образца и геометрия прибора, чем величины относительной высоты пиков. Поэтому, согласно одному аспекту, кристаллическая форма II характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, в которой положения пиков по существу соответствуют положениям пиков, представленным на фиг. 5.

Согласно одному аспекту, кристаллическую форму II характеризуют по ее поведению в результате воздействия высокой температурой. Как представлено на фиг. 6, кривая дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), записанная при скорости нагревания  $10^\circ\text{C}$  в минуту, характеризуется пиком эндотермического теплового потока, отождествляемого с переходом в расплав, с максимумом эндотермического теплового потока при температуре  $238,1^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$ . Согласно другому аспекту форма II характеризуется кривой дифференциальной сканирующей калориметрии, по существу соответствующей кривой, представленной на фиг. 6.

На кривой термогравиметрического анализа (TGA) на фиг. 7 продемонстрирована потеря массы, ассоциированная с разложением после  $222^\circ\text{C}$ .

Иллюстративная кривая DMS для формы II представлена на фиг. 8. Общее поглощение влаги при значениях относительной влажности (RH) в диапазоне от 5 до 90% составляло 0,02%. Форма II является негигроскопичной.

Как описано в получении 20, форма II может быть получена путем суспендирования соединения 2-6 в смеси EtOH и THF, охлажденной до  $5^\circ\text{C}$ . К этой суспензии может быть добавлен  $\text{LiBH}_4$ . После добавления температура может повыситься до  $10^\circ\text{C}$  и реакционная смесь может перемешиваться в течение 2 ч. Реакционная смесь может быть погашена смесью хлорида аммония, растворенного в воде. После нагревания до  $45^\circ\text{C}$  для формирования кристаллов может быть медленно добавлена вода. Полученную взвесь можно выдерживать при  $45^\circ\text{C}$  в течение нескольких часов, затем может перемешиваться при  $15^\circ\text{C}$  и фильтроваться. Кристаллическая форма II может быть промыта EtOH и водой, а затем высушена с получением формы II промежуточной степени очистки.

Эта форма II промежуточной степени очистки может быть растворена в DMSO при нагревании с последующим медленным добавлением n-PrOH с поддержанием внутренней температуры приблизительно при  $86^\circ\text{C}$ . Смесь перемешивают приблизительно при  $92^\circ\text{C}$  приблизительно в течение 4 ч. Затем полученную смесь медленно охлаждают приблизительно до  $20^\circ\text{C}$  и перемешивают приблизительно при  $20^\circ\text{C}$  в течение нескольких часов. Затем форма II может быть выделена путем фильтрования. Кристаллическая Форма II может быть промыта nPrOH и этанолом с последующим фильтрованием.

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способу очистки кристаллической

формы II промежуточной степени очистки, причем способ включает в себя: (а) растворение формы II промежуточной степени очистки в растворителе, таком как DMSO, с нагреванием смеси; (b) медленное добавление n-PrOH; (с) нагревание смеси приблизительно при 90°C; (d) охлаждение раствора приблизительно до 20°C и (е) выделение кристаллической формы II из реакционной смеси, например, путем фильтрования.

#### Фармацевтические композиции

Соединение (I) и его фармацевтически приемлемые соли обычно используют в виде фармацевтической композиции или лекарственной формы. Соединение (I) может присутствовать в виде кристаллической формы, такой как форма I или форма II. Подобные фармацевтические композиции могут быть введены пациенту любым приемлемым путем введения, включая без ограничения пероральный, местный (в том числе трансдермальный), ректальный, интраназальный, ингаляционный и парентеральный способы введения.

Соответственно согласно одному из аспектов, относящемуся к композициям, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель и соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль. Согласно другому аспекту, относящемуся к композициям, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель и кристаллическую форму соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли, например, форму I или форму II. Подобные фармацевтические композиции могут необязательно содержать другие терапевтические средства и/или средства для приготовления лекарственных форм. При обсуждении композиций и их применений "соединение согласно настоящему изобретению" также может называться в данном описании "действующим веществом".

Фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию обычно содержат терапевтически эффективное количество соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли. Тем не менее, специалистам в данной области техники следует понимать, что фармацевтическая композиция может содержать большее, чем терапевтически эффективное, количество, т.е. представлять собой нефасованные композиции, или меньшее, чем терапевтически эффективное, количество, т.е. представлять собой отдельные стандартные дозы, предназначенные для многократного введения с целью получения терапевтически эффективного количества.

Как правило, подобные фармацевтические композиции содержат приблизительно от 0,1 приблизительно до 95 мас.% действующего вещества; включая приблизительно от 5 приблизительно до 70 мас.% действующего вещества.

В фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению может быть использован любой традиционный носитель или наполнитель. Выбор конкретного носителя или наполнителя, или комбинации носителей или наполнителей, будет зависеть от способа введения, используемого при лечении конкретного пациента, или типа медицинского состояния или патологического состояния. В этой связи, приготовление подходящей фармацевтической композиции для конкретного способа введения хорошо согласуется с компетенциями специалистов в области фармацевтики. Кроме того, носители или наполнители, используемые в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению, являются коммерчески доступными. В качестве дополнительной иллюстрации, традиционные методики приготовления лекарственных форм описаны в документах Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000) и H.C. Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999).

Иллюстративные примеры соединений, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают в себя без ограничения следующие вещества: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозы, такие как микрокристаллическая целлюлоза и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; наполнители, такие как масло какао и воски для суппозитория; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновая кислота; апирогенная вода; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; фосфатные буферные растворы и другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических композициях.

Фармацевтические композиции обычно получают путем тщательного и однородного смешивания или составления смеси активного агента с фармацевтически приемлемым носителем и одним или несколькими необязательными ингредиентами. Затем полученная равномерно составленная смесь может быть сформована или загружена в таблетки, капсулы, пилюли и т.п. с использованием традиционных методик и оборудования.

Фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию могут быть расфасованы в стандартную лекарственную форму. Термин "стандартная лекарственная форма" относится к физически дис-

кретной единице, пригодной для дозированного введения пациенту, т.е. к каждой единице, содержащей заданное количество действующего вещества, которое рассчитано для получения целевого терапевтического эффекта как отдельно, так и в комбинации с одной или несколькими дополнительными единицами. Например, подобные стандартные лекарственные формы могут представлять собой капсулы, таблетки, пилюли и т.п., или отдельные упаковки, пригодные для парентерального введения.

Согласно одному варианту осуществления фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению подходят для перорального введения. Фармацевтические композиции, подходящие для перорального введения, могут быть приготовлены в виде капсул, таблеток, пилюль, лепешек, крахмальных облаток, драже, порошков, гранул; или в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости; или в виде жидкой эмульсии типа "масло-в-воде" или "вода-в-масле"; или в виде эликсира или сиропа; и т.п.; причем каждая фармацевтическая композиция содержит заранее определенное количество соединения согласно настоящему изобретению в качестве действующего ингредиента.

Будучи предназначенными для перорального введения в виде твердой лекарственной формы (например, в виде капсул, таблеток, пилюль и т.п.), фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию обычно содержат действующее вещество или его фармацевтически приемлемую соль и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей. Такие твердые лекарственные формы могут также необязательно включать в себя: наполнители или разбавители, такие как крахмалы, микрокристаллическая целлюлоза, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремневая кислота; связующие вещества, такие как карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или аравийская камедь; увлажнители, такие как глицерин; разрыхлители, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или крахмал из тапиоки, альгиновая кислота, некоторые силикаты и/или карбонат натрия; замедляющие растворение агенты, такие как парафин; ускорители всасывания, такие как четвертичные аммониевые соединения; смачивающие агенты, такие как цетиловый спирт и/или моностеарат глицерина; абсорбенты, такие как каолин и/или бентонитовая глина; лубриканты, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и/или их смеси; пигменты; и буферные добавки.

В фармацевтических композициях согласно настоящему раскрытию также могут присутствовать регуляторы высвобождения, смачивающие агенты, глазировочные средства, подсластители, вкусовые и ароматизирующие добавки, консерванты и антиоксиданты. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают в себя водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфат натрия, сульфит натрия и т.п.; растворимые в масле антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилзамещенный гидроксианизол, бутилзамещенный гидрокситолуол, лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и хелатирующие металлы агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота, сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п. Глазировочные средства для таблеток, капсул, пилюль и т.п. включают в себя средства, используемые для энтеросолюбильных покрытий, такие как ацетатфталат целлюлозы, поливинилацетатфталат, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, сополимеры метакриловой кислоты и сложного эфира метакриловой кислоты, ацетаттримеллитат целлюлозы, карбоксиметилэтилцеллюлоза, ацетатсукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы и т.п.

Фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию также могут быть приготовлены для обеспечения медленного или регулируемого высвобождения действующего вещества с использованием, например, гидроксипропилметилцеллюлозы в различных пропорциях, или других полимерных матриц, липосом и/или микросфер. Кроме того, фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию могут необязательно содержать агенты, придающие непрозрачность, и могут быть составлены таким образом, что они высвобождают лишь активный ингредиент или предпочтительно высвобождают действующий ингредиент в определенной части желудочно-кишечного тракта, необязательно пролонгированным образом. Примеры используемых имплантируемых композиций включают в себя полимерные вещества и воски. Действующее вещество также может находиться в виде микрокапсул, в случае необходимости вместе с одним или несколькими описанными выше наполнителями.

Подходящие жидкие лекарственные формы для перорального введения включают в себя, в качестве иллюстрации, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Жидкие лекарственные формы, как правило, содержат действующее вещество и инертный разбавитель, такой как, например, вода или другие растворители, солюбилизаторы и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное масла, масло из семечек, оливковое, касторовое и кунжутное масла), олеиновую кислоту, глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана и их смеси. В качестве альтернативы, определенные жидкие лекарственные формы могут быть преобразованы, например, путем распылительной сушки, в порошки, которые используют для получения твердых лекарственных форм посредством традиционных методов.

Помимо действующего ингредиента или его фармацевтически приемлемой соли, суспензии могут содержать суспендирующие средства, такие как, например, этоксилированные изостеариловые спирты,

полиоксиэтиленсорбит и сложные эфиры сорбитана, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант и их смеси.

Соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль также можно вводить парентерально (например, путем внутривенной, подкожной, внутримышечной или внутрибрюшинной инъекции). Для парентерального введения действующее вещество или его фармацевтически приемлемую соль обычно смешивают с подходящим для парентерального введения носителем, включая, например, стерильные водные растворы, солевой раствор, низкомолекулярные спирты, такие как пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, желатин, эфиры жирных кислот, такие как этилолеат, и т.п. Парентеральные лекарственные формы также могут содержать один или несколько антиоксидантов, солюбилизаторов, стабилизаторов, консервантов, смачивающих агентов, эмульгаторов, буферных агентов или диспергаторов. Указанные лекарственные формы могут быть преобразованы в стерильные путем использования стерильной среды для инъекций, стерилизующего средства, с помощью фильтрации, облучения или путем тепловой обработки.

В качестве альтернативы, фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению приготавливают для введения путем ингаляции. Подходящие фармацевтические композиции для введения путем ингаляции обычно находятся в виде аэрозоля или порошка. Подобные композиции, как правило, вводят с помощью хорошо известных устройств для доставки, таких как дозирующий ингалятор, ингалятор для ингаляции сухого порошка, распылитель или аналогичное устройство для доставки.

При введении путем ингаляции с использованием герметичного контейнера фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению обычно содержат действующий ингредиент и подходящий пропеллент, такой как дихлордифторметан, трихлорфторметан, дихлортетрафторэтан, диоксид углерода или другой подходящий газ.

Кроме того, фармацевтическая композиция может находиться в виде капсулы или картриджа (изготовленного, например, из желатина), содержащего соединение согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль и порошок, пригодный для использования в порошковом ингаляторе. Подходящие порошковые основы включают в себя, например, лактозу или крахмал.

#### **Местные лекарственные формы**

Для лечения кожных заболеваний соединение согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль предпочтительно включают в лекарственную форму для местного введения в кожу. Композиции для местного применения включают в себя жидкие или полутвердые носители, которые могут содержать без ограничения полимеры, загустители, буферы, нейтрализаторы, хелатообразующие агенты, консерванты, поверхностно-активные вещества или эмульгаторы, антиоксиданты, воски или масла, смягчающие вещества, солнцезащитные средства и растворитель или систему смешанных растворителей. Композиции для местного применения, применимые в настоящем изобретении, могут быть изготовлены в виде широкого спектра продуктов. К ним относятся без ограничения лосьоны, кремы, гели, карандаши, спреи, мази, пасты, пены, муссы и очищающие средства. Указанные типы продуктов могут включать в себя несколько типов систем переноса, включая без ограничения частицы, наночастицы и липосомы. При желании могут быть добавлены разрыхлители, такие как сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или ее соль, такая как альгинат натрия. Методики приготовления лекарственных форм и введения могут быть найдены в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Ed. (Easton, Pa.: Mack Publishing Co., 1995). Лекарственная форма может быть выбрана для повышения до максимума доставки до желаемой мишени в организме.

Лосьоны, которые представляют собой препараты, которые должны наноситься на кожу или поверхность волос без трения, обычно представляют собой жидкие или полужидкие препараты, в которых диспергированы тонкоизмельченные твердые, воскообразные или жидкие вещества. Лосьоны обычно содержат суспендирующие агенты для получения лучших дисперсий, а также соединения, применимые для локализации и удерживания действующего вещества в контакте с кожей или волосами, например метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия и т.п.

Кремы, содержащие действующее вещество или его фармацевтически приемлемую соль для доставки в соответствии с настоящим изобретением, представляют собой вязкие жидкие или полутвердые эмульсии, либо типа "масло-в-воде", либо типа "вода-в-масле". Основы кремов являются смываемыми водой и содержат масляную фазу, эмульгатор и водную фазу. Масляная фаза, как правило, состоит из вазелинового масла или жирного спирта, такого как цетиловый или стеариловый спирт; водная фаза обычно, хотя и не обязательно, превышает масляную фазу по объему и, как правило, содержит увлажнитель. Эмульгатор в составе крема, как разъяснено в Remington: Science and Practice of Pharmacy, как правило, представляет собой неионогенное, анионогенное, катионогенное или амфотерное поверхностно-активное вещество. Компоненты кремовых лекарственных форм могут включать в себя: масляные основы, такие как вазелиновое масло, минеральные масла, растительные и животные масла и триглицериды; основы для кремов, такие как ланолиновые спирты, стеариновая кислота и цетостеариловый спирт; основу для гелей, такую как поливиниловый спирт; растворители, такие как пропиленгликоль и полиэтиленгликоль; эмульгаторы, такие как полисорбаты, стеараты, такие как глицерилстеарат, октилгидроксистерат, полиоксилстеарат, PEG стеариловые эфиры, изопропилпальмитат и сорбитана моностеарат; стаби-

лизаторы, такие как полисахариды и сульфит натрия; смягчающие средства (то есть увлажнители), такие как триглицериды со средней длиной цепи, изопропилмиристат и диметикон; загустители, такие как цетиловый спирт и стеариловый спирт; антимикробные средства, такие как метилпарабен, пропилпарабен, феноксиэтанол, сорбиновая кислота, диазолидинилмочевина и бутилированный гидроксизанол; усилители проникновения, такие как N-метилпирролидон, пропиленгликоль, полиэтиленгликольмонолаурат и т.п.; и хелатообразующие агенты, такие как эдетат динатрия.

Гелевые лекарственные формы также могут быть использованы в связи с настоящим изобретением. Специалистам в работающем в области приготовления лекарственных форм для местного применения следует понимать, что гели являются полутвердыми. Однофазные гели содержат органические макромолекулы, по существу равномерно распределенные во всей жидкости-носителе, которая обычно является водной, но также может представлять собой растворитель или смесь растворителей.

Мази, которые являются полутвердыми препаратами, обычно основаны на вазелиновом масле или других продуктах нефтепереработки. Специалистам в данной области техники следует понимать, что подлежащая использованию конкретная основа для мазей обеспечивает оптимальную доставку действующего вещества, выбранного для данной композиции, и, предпочтительно, обеспечивает другие желаемые характеристики, например, умягчение и т.п. Как и в случае других носителей или основ, основа для мазей должна быть инертной, стабильной, не вызывающей раздражения и не сенсibiliзирующей. Как разъяснено в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Ed. (Easton, Pa.: Mack Publishing Co., 1995) на страницах 1399-1404, основы для мазей могут быть разделены на четыре класса: маслянистые основы; эмульгируемые основы; эмульсионные основы; и водорастворимые основания. Масляные основы для мазей включают в себя, например, растительные масла, жиры, полученные от животных, и полутвердые углеводороды, полученные из нефти. Эмульгируемые основы для мазей, также известные как абсорбирующие основы для мазей, содержат мало воды или не содержат ее совсем, и включают в себя, например, гидроксистеаринсульфат, безводный ланолин и гидрофильный вазелин. Эмульсионные основы для мазей представляют собой либо эмульсии типа "вода-в-масле" (W/O), либо эмульсии типа "масло-в-воде" (O/W), и включают в себя, например, цетиловый спирт, глицерилмоностеарат, ланолин и стеариновую кислоту. Водорастворимые основы для мазей могут быть получены из полиэтиленгликолей различной молекулярной массы; для дополнительной информации опять же может быть приведена ссылка на Remington: The Science and Practice of Pharmacy, см. выше. Подходящие масляные вещества для использования в лекарственных формах в виде мази включают в себя вазелиновое масло (вазелин), пчелиный воск, масло какао, масло ши и цетиловый спирт. При желании, мази могут необязательно дополнительно содержать усилители проникновения.

Применимые лекарственные формы согласно настоящему изобретению также охватывают спреи. Спреи, как правило, обеспечивают действующее вещество в водном и/или спиртовом растворе, который для доставки можно нанести на кожу или волосы. Такие спреи включают в себя спреи, которые составлены для обеспечения концентрации раствора действующего вещества в месте введения после доставки, например, распыляемый раствор может состоять главным образом из спирта или другой подобной летучей жидкости, в которой может быть растворено лекарственное средство или действующее вещество. При доставке на кожу или волосы носитель испаряется, оставляя концентрированное активное вещество в месте введения.

Фармацевтические композиции для местного применения также могут содержать подходящие твердые носители или носители в гелевой фазе. Примеры таких носителей включают в себя без ограничения карбонат кальция, фосфат кальция, различные сахара, крахмалы, производные целлюлозы, желатин и полимеры, такие как полиэтиленгликоли.

Фармацевтические композиции для местного применения также могут содержать подходящий эмульгатор, который относится к средству, который усиливает или облегчает смешивание и суспендирование по типу "масло-в-воде" или "вода-в-масле". Используемый в настоящем документе эмульгирующий агент может состоять из единственного эмульгирующего агента или может представлять собой неионогенное, анионогенное, катионогенное или амфотерное поверхностно-активное вещество или смесь двух или нескольких таких поверхностно-активных веществ; предпочтительными для использования в настоящем документе являются неионогенные или анионные эмульгаторы. Такие поверхностно-активные агенты описаны в документе "McCutcheon's Detergent and Emulsifiers," North American Edition, 1980 Annual, опубликованном McCutcheon Division, MC Publishing Company, 175 Rock Road, Glen Rock, NJ. 07452, USA.

Могут использоваться высокомолекулярные спирты, такие как цетеариловый спирт, цетиловый спирт, стеариловый спирт, эмульгирующий воск, глицерилмоностеарат. Другими примерами являются дистеарат этиленгликоля, тристеарат сорбитана, моностеарат пропиленгликоля, моноолеат сорбитана, моностеарат сорбитана (SPAN 60), монолаурат диэтиленгликоля, монопальмитат сорбита, диолеат сахарозы, стеарат сахарозы (CRODESTA-160), лауриловый эфир полиоксиэтилена (BRIJ 30), полиоксиэтилен (2) стеариловый эфир (BRIJ 72), полиоксиэтилен (21) стеариловый эфир (BRIJ 721), моностеарат полиоксиэтилена (Murf 45), моностеарат полиоксиэтилсorbitана (TWEEN 60), моноолеат полиоксиэтилсorbitана (TWEEN 80), монолаурат полиоксисorbitана (TWEEN 20) и олеат натрия. Холестерин и про-

изводные холестерина также могут быть использованы в эмульсиях для наружного применения.

Пример подходящих неионогенных эмульгирующих агентов описан Paul L. Lindner в документе "Emulsions and Emulsion", edited by Kenneth Lissant, published by Dekker, New York, N. Y., 1974. Примеры неионогенных эмульгаторов, которые могут быть использованы, включают в себя без ограничения продукты BRU, такие как BRIJ 2 (полиоксиэтилен (2) стеариловый эфир), BRIJ S20 (полиоксиэтилен (20) стеариловый эфир), BRIJ 72 (полиоксиэтилен (2) стеариловый эфир с HLB 4,9), BRIJ 721 (полиоксиэтилен (21) стеариловый эфир с HLB 15,5), Brij 30 (полиоксиэтилен лауриловый эфир с HLB 9,7), Polawax (эмульгирующий воск с HLB 8,0), Span 60 (моностеарат сорбита с HLB 4,7), Crodesta F-160 (стеарат сахарозы с HLB 14,5).

Фармацевтические композиции для местного применения также могут содержать подходящие умягчающие средства. Умягчающие средства представляют собой вещества, используемые для предупреждения или смягчения сухости, а также для защиты кожи или волос. Применимые умягчающие средства включают в себя без ограничения цетиловый спирт, изопропилмиристат, стеариловый спирт и т.п. Широкий выбор подходящих умягчающих средств известен и может быть использован в настоящем документе; см. например, документы Sagarin, Cosmetics, Science and Technology, 2nd Edition, Vol. 1, pp. 32-43 (1972) и патент № США 4919934, выданный Deckner et al., поданный 24 апреля 1990 г., которые оба включены во всей своей полноте в настоящий документ посредством ссылки.

Фармацевтические композиции для местного применения также могут содержать подходящие антиоксиданты, вещества, которые, как известно, ингибируют окисление. Антиоксиданты, подходящие для использования в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя без ограничения бутилированный гидрокситолуол, аскорбиновую кислоту, аскорбат натрия, аскорбат кальция, аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол, 2,4,5-тригидроксibuтирофенон, 4-гидроксиметил-2,6-ди-трет-бутилфенол, эриторбиновую кислоту, гваяковую смолу, пропилгаллат, тиодипропионовую кислоту, дилаурилтиодипропионат, трет-бутилгидрохинон и токоферолы, такие как витамин Е, и т.п., включая фармацевтически приемлемые соли и сложные эфиры указанных соединений. Предпочтительно антиоксидант представляет собой бутилированный гидрокситолуол, бутилированный гидроксианизол, пропилгаллат, аскорбиновую кислоту, их фармацевтически приемлемые соли или сложные эфиры, или их смеси. Наиболее предпочтительно антиоксидант представляет собой бутилированный гидрокситолуол.

Фармацевтические композиции для местного применения также могут содержать подходящие консерванты. Консерванты представляют собой соединения, добавляемые в фармацевтическую композицию для действия в качестве антимикробного агента. К консервантам, известным в данной области техники как эффективные и приемлемые в парентеральных препаратах, относятся хлорид бензалкония, бензетоний, хлоргексидин, фенол, мета-крезол, бензиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлорбутанол, ортокрезол, пара-крезол, хлоркрезол, нитрат фенилртути, тимеросал, бензойная кислота и их различные смеси; см., например, Wallhauser, K.-H., Develop. Biol. Standard, 24:9-28 (1974) (S. Krager, Basel).

Фармацевтические композиции для местного применения также могут содержать подходящие хелатирующие агенты для формирования комплексов с катионами металлов, которые не проникают через липидный барьер. Примеры подходящих хелатообразующих агентов включают в себя этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), этиленгликоль-бис(бета-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусную кислоту (EGTA) и тетракалиевую соль 8-амино-2-[(2-амино-5-метилфенокс)метил]-6-метоксихинолин-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты (QUIN-2). Предпочтительно хелатирующими агентами являются ЭДТА и лимонная кислота.

Фармацевтические композиции для местного применения также могут содержать подходящие нейтрализующие агенты, используемые для корректировки pH композиции до фармацевтически приемлемого диапазона. Примеры нейтрализующих агентов включают в себя без ограничения троламин, трометамин, гидроксид натрия, соляную кислоту, лимонную кислоту и уксусную кислоту.

Фармацевтические композиции для местного применения также могут содержать подходящие повышающие вязкость агенты. Данные компоненты являются диффундирующими соединениями, способными увеличивать вязкость полимерсодержащего раствора посредством взаимодействия агента с полимером. В качестве агента, повышающего вязкость может использоваться Carbopol Ultrez 10.

Жидкие лекарственные формы, такие как лосьоны, подходящие для местного применения, могут включать в себя подходящий водный или неводный носитель с буферами, суспендирующими и диспергирующими агентами, загустителями, усилителями проникновения и т.п. Твердые лекарственные формы, такие как кремы или пасты и т.п., могут включать в себя, например, любой из следующих ингредиентов, воду, масло, спирт или смазку в качестве субстрата с поверхностно-активным веществом, полимерами, таким как полиэтиленгликоль, загустителями, твердыми веществами и т.п. Жидкие или твердые лекарственные формы могут включать в себя технологические средства для улучшения доставки, такие как липосомы, микросомы, микрогубки и т.п. Кроме того, соединения могут быть доставлены с использованием системы с замедленным высвобождением, такой как полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащих терапевтическое средство. Различные материалы с замедленным высвобождением были созданы и хорошо известны специалистам в данной области техники.

В лекарственной форме для местного применения соединение (I) или его фармацевтически прием-

лемая соль может содержаться в количестве от 0,1 до 50 мас.%. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль содержится в количестве от 0,1 до 25 мас.%. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения (I) или его фармацевтически приемлемая соль содержится в количестве от 0,1 до 10 мас.%. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения (I) или его фармацевтически приемлемая соль содержится в количестве от 0,25 до 5 мас.%. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения (I) или его фармацевтически приемлемая соль содержится в количестве от 0,25 до 2 мас.%. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения (I) или его фармацевтически приемлемая соль содержится в количестве от 0,25 до 1 мас.%. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения (I) или его фармацевтически приемлемая соль содержится в количестве от 0,05 до 0,5 мас.%.

Согласно некоторым вариантам осуществления, соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль содержится в количестве приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,25, 3,5, 3,75, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 или 10 мас.%.

Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция, содержащая соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль, дополнительно содержит одно или несколько дополнительных терапевтических средств. Согласно некоторым вариантам осуществления одно или несколько дополнительных терапевтических средств применимы для лечения аутоиммунного кожного заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления одно или несколько дополнительных терапевтических средств применимы для лечения воспалительного кожного заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления одно или несколько дополнительных терапевтических средств применимы для лечения атопического дерматита. Согласно некоторым вариантам осуществления одно или несколько дополнительных терапевтических средств применимы для лечения гнездной алопеции. Конкретный класс соединений или конкретные соединения, которые могут быть объединены с соединением (I) в фармацевтической композиции, проиллюстрированы в последующих параграфах.

Следующие неограничивающие примеры иллюстрируют характерные фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению.

#### **Пероральная твердая лекарственная форма в виде таблетки**

Соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль подвергают сухому смешиванию с микрокристаллической целлюлозой, поливинилпирролидоном и кроскармеллозой натрия в соотношении 4:5:1:1 и путем прессования в таблетки получают стандартную лекарственную форму, содержащую, например 5, 20 или 40 мг действующего вещества на таблетку.

#### **Пероральная твердая лекарственная форма в виде капсулы**

Соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль объединяют с микрокристаллической целлюлозой, поливинилпирролидоном и кроскармеллозой натрия в соотношении 4:5:1:1 путем мокрого гранулирования и загружают в капсулы из желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы с получением стандартной лекарственной формы, содержащей, например, 5, 20 или 40 мг действующего вещества на капсулу.

#### **Жидкая лекарственная форма**

Жидкую лекарственную форму, содержащую соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль (0,1%), воду (98,9%) и аскорбиновую кислоту (1,0%), получают путем добавления соединения согласно настоящему изобретению к смеси воды и аскорбиновой кислоты.

#### **Пероральная лекарственная форма с энтеросолюбильным покрытием**

Соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль растворяют в водном растворе, содержащем поливинилпирролидон, и наносят путем распыления на гранулы из микрокристаллической целлюлозы или сахара с соотношением действующее вещество:гранулы=1:5 мас./мас., а затем наносят увеличивающее массу приблизительно на 5% энтеросолюбильное покрытие, которое содержит акриловый сополимер, например комбинацию акриловых сополимеров, доступную под торговыми марками Eudragit-L® и Eudragit-S®, или ацетатсукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы. Гранулы с энтеросолюбильным покрытием загружают в капсулы из желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы с получением стандартной лекарственной формы, содержащей, например, 30 мг действующего вещества на капсулу.

#### **Пероральная лекарственная форма с энтеросолюбильным покрытием**

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

#### **Лекарственная форма в виде мази для местного введения**

Соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль объединяют с вазелиновым маслом, C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>-триглицеридом, октилгидроксистеаратом и N-метилпирролидоном в соотношении для получения композиции, содержащей от 0,05 до 5 мас.% действующего вещества.

#### **Лекарственная форма в виде мази для местного введения**

Соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль объединяют с вазелиновым маслом, C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>-триглицеридом, октилгидроксистеаратом, бензиловым спиртом и N-метилпирролидоном в соотношении для получения композиции, содержащей от 0,05 до 5 мас.% действующего вещества.

#### **Лекарственная форма в виде мази для местного введения**

Соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль объединяют с белым вазелином, пропиленгликолем, моно- и ди-глицеридами, парафином, бутилированным гидрокситолуолом и динатрия-кальция эдетатом в соотношении для получения композиции, содержащей от 0,05 до 5 мас.% действующего вещества.

#### **Лекарственная форма в виде мази для местного введения**

Соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль объединяют с минеральным маслом, парафином, пропиленкарбонатом, белым вазелином и белым воском с получением композиции, содержащей от 0,05 до 5 мас.% действующего вещества.

#### **Лекарственная форма в виде крема для местного введения**

Минеральное масло объединяют с соединением (I) или его фармацевтически приемлемой солью, пропиленгликолем, изопропилпальмитатом, полисорбатом 60, цетиловым спиртом, сорбитанмоностеаратом, полиоксил 40 стеаратом, сорбиновой кислотой, метилпарабенном и пропилпарабенном с формированием масляной фазы, которую объединяют с очищенной водой путем смешивания с усилием сдвига с получением композиции, содержащей от 0,05 до 5 мас.% действующего вещества.

#### **Лекарственная форма в виде крема для местного введения**

Лекарственная форма в виде крема, содержащая соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль, бензиловый спирт, цетиловый спирт, безводную лимонную кислоту, моно- и ди-глицериды, олеиловый спирт, пропиленгликоль, цетостеарилсульфат натрия, гидроксид натрия, стеариловый спирт, триглицериды и воду, содержит от 0,05 до 5 мас.% действующего вещества.

#### **Лекарственная форма в виде крема для местного введения**

Лекарственная форма в виде крема, содержащая соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль, цетостеариловый спирт, изопропилмиристат, пропиленгликоль, цетомакрогол 1000, диметикон 360, лимонную кислоту, цитрат натрия и очищенную воду с имидомочевинной, метилпарабенном и пропилпарабенном в качестве консервантов, содержит от 0,05 до 5 мас.% действующего вещества.

#### **Лекарственная форма в виде крема для местного введения**

Лекарственная форма в виде крема, содержащая соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль, стеариновую кислоту, цетостеариловый спирт, изопропилпальмитат, октилгидроксистеарат, BRIJ S2 (PEG 2 стеариловый эфир), BRIJ S20 (PEG 20 стеариловый эфир), N-метилпирролидин, PEG и воду, содержит от 0,05 до 5 мас.% действующего вещества.

#### **Лекарственная форма в виде крема для местного введения**

Лекарственная форма в виде крема, содержащая соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль, стеариновую кислоту, цетостеариловый спирт, изопропилпальмитат, октилгидроксистеарат, BRIJ S2 (PEG 2 стеариловый эфир), BRIJ S20 (PEG 20 стеариловый эфир), N-метилпирролидин, PEG400 и воду, содержит от 0,05 до 5 мас.% действующего вещества.

#### **Применимость**

Было показано, что соединение (I) является мощным ингибитором ферментов семейства JAK: JAK1, JAK2, JAK3 и TYK2. Ингибирование ферментов семейства JAK может ингибировать передачу сигналов многих ключевых провоспалительных цитокинов. Поэтому предполагается, что соединение (I) будет применимо при лечении воспалительных заболеваний, таких как воспалительные желудочно-кишечные заболевания, воспалительные и сопровождающиеся зудом кожные заболевания, воспалительные глазные заболевания и воспалительные респираторные заболевания.

#### **Воспалительное кожное заболевание**

Атопический дерматит был связан с повышением содержания провоспалительных цитокинов, которые зависят от сигнального пути JAK-STAT, в частности IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 и IFN $\gamma$ . Поскольку соединение (I) демонстрирует эффективное ингибирование всех четырех ферментов JAK, предполагается, что они будут эффективно ингибировать провоспалительные цитокины, характерные для атопического дерматита и других воспалительных кожных заболеваний. Также было показано, что соединение (I) характеризуется значением pIC<sub>50</sub> 7,8 для ингибирования TSLP-индуцированного высвобождения TARC в методе анализа 4. Соединение (I) характеризуется значением pIC<sub>50</sub> 8,5 для ингибирования IL-13-индуцированного фосфорилирования STAT6 в клеточных методах анализа, описанных в методе анализа 2. Соединение (I) также характеризуется значением pIC<sub>50</sub> 8,3 для ингибирования IL-13-индуцированного фосфорилирования STAT6 в нормальных эпидермальных кератиноцитах человека в методе анализа 13. Кроме того, модельные лекарственные формы соединения (I) в виде крема и мази в методе анализа 6 продемонстрировали значительное воздействие соединения в эпидермальном и дермальном слоях у мини-пигов без значимого воздействия на плазму крови. При фармакодинамическом методе анализа ex vivo с использованием свежеекссеченной кожи человека было показано, что соединение (I) ингибирует экспрессию генов CXCL10 и CCL2. Было показано, что соединение (I) обладает хорошей проницаемостью в

методе анализа на коже человека. Соединение (I) также ингибирует IL-31-индуцированную продукцию pSTAT3 на 80% в модели *in vivo* в методе анализа 9. В завершение, соединение (I) характеризуется зависимым от дозы эффектом в модели ТРА-индуцированного ирритантного контактного дерматита на мышах в методе анализа 10.

Также было показано, что соединение (I) характеризуется значением  $pIC_{50}$  8,4 для ингибирования IL-2-индуцированного фосфорилирования STAT5 в клеточных методах анализа, описанных в методе анализа 11, значением  $pIC_{50}$  7,2 для ингибирования IL-12-индуцированного фосфорилирования STAT4 в CD3<sup>+</sup> Т-клетках человека в методе анализа 12, значением  $pIC_{50}$  8,4 для ингибирования IL-22-индуцированного фосфорилирования STAT3 в нормальных эпидермальных кератиноцитах человека в методе анализа 14. В завершение, восстановление соединением (I) супрессированной интерлейкином-22 (IL-22) экспрессии филагрина наблюдали при концентрации <1 мкМ. IL-12, IL-22 и IL-23 являются цитокинами, причастными к псориазу (Baliwag et al., *Cytokine*, 2015, 73(2), 342-350 2015). Указанные цитокины передают сигналы через ферменты JAK2 и Tyk2 (Ishizaki et al., *J. Immunol.*, 2011, 187, 181-189). Терапия антителами, целенаправленно воздействующая на указанные цитокины, продемонстрировали клиническую применимость при псориазе (Schadler et al., *Disease-a-Month*, 2018, 1-40). Можно предполагать, что местный ингибитор JAK, который может блокировать указанные цитокины, будет эффективен при данном заболевании. Поскольку указанные цитокины передают сигналы через Tyk2 и JAK2, предполагается, что соединение (I) обладает активностью в отношении данного заболевания.

Предполагается, что устойчивое содержание ингибиторов JAK в коже в отсутствие значительного системного содержания приведет к мощной местной противовоспалительной и противозудной активности в коже без побочных эффектов, вызванных системным воздействием. Предполагается, что такие соединения будут полезны при ряде кожных воспалительных или сопровождающихся зудом состояний, которые включают в себя без ограничения атопический дерматит, витилиго, кожную Т-клеточную лимфому и ее подтипы (синдром Сезари, грибовидный микоз, педжетоидный ретикулез, гранулематозная дряблая кожа, лимфоматозный папулез, хронический лихеноидный параспориоз, острый лихеноидный и вариолиформный параспориоз, CD30<sup>+</sup> кожная Т-клеточная лимфома, вторичная кожная CD30<sup>+</sup> крупноклеточная лимфома, отличная от грибовидного микоза CD30<sup>+</sup> кожная Т-клеточная лимфома, плеоморфная Т-клеточная лимфома, лимфома Леннерта, Т-клеточная лимфома подкожного типа, ангиоцентрическая лимфома, бластная NK-клеточная лимфома), узловатую чесотку, красный плоский лишай, контактный дерматит, дисгидротическую экзему, экзему, нумулярный дерматит, себорейный дерматит, застойный дерматит, первично локализованный амилоидоз кожи, буллезный пемфигоид, кожные проявления реакции "трансплантат против хозяина", пемфигоид, дискоидную волчанку, анулярную гранулему, хронический простой лишай, зуд, зуд в области вульвы/мошонки/перианальный зуд, склеротический лишай, зуд при постгерпетической невралгии, плоский фолликулярный лишай, псориаз и декальвирующий фолликулит. В частности, атопический дерматит (Bao et al., *JAK-STAT*, 2013, 2, e24137), гнездная алопеция (Xing et al., *Nat Med.* 2014, 20, 1043-1049), включая ее подтипы, такие как одноочаговая гнездная алопеция, многоочаговая гнездная алопеция, краевая гнездная алопеция, универсальная гнездная алопеция, тотальная гнездная алопеция и гнездная алопеция бороды, витилиго (Craiglow et al, *JAMA Dermatol.* 2015, 151, 1110-1112), кожная Т-клеточная лимфома (Netchiporouk et al., *Cell Cycle*. 2014; 13, 3331-3335), узловатая чесотка (Sunkoly et al., *J Allergy Clin Immunol.* 2006, 117, 411-417), красный плоский лишай (Welz-Kubiak et al., *J Immunol Res.* 2015, ID:854747), первично локализованный амилоидоз кожи (Tanaka et al., *Br J Dermatol.* 2009, 161, 1217-1224), буллезный пемфигоид (Feliciani et al., *Int J Immunopathol Pharmacol.* 1999, 12, 55-61) и кожные проявления реакции "трансплантат против хозяина" (Okiyama et al., *J Invest Dermatol.* 2014, 134, 992-1000) характеризуются повышением содержания определенных цитокинов, передающих сигналы посредством активации JAK. Соответственно, соединение (I) может быть способно облегчать ассоциированное кожное воспаление или зуд, вызываемые указанными цитокинами. В частности, предполагается, что соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль применимы для лечения атопического дерматита и других воспалительных заболеваний кожи.

Как представлено в табл. 13, было показано, что соединение (I) характеризуется высоким клиренсом в микросомах человека. По этой причине она обладает преимуществом быстрой очистки, что сводит к минимуму системное воздействие и снижает риск побочных эффектов.

Как представлено в табл. 13, соединение (I) также обладает высокой проницаемостью, что благоприятно для кожных назначений, что, по-видимому, связано с лучшим проникновением в кожу.

Поэтому согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения воспалительного или аутоиммунного кожного заболевания у млекопитающего (например, человека), включающему в себя нанесение фармацевтической композиции, содержащей соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтический носитель на кожу млекопитающего.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения воспалительного или аутоиммунного кожного заболевания у млекопитающего (например, человека), включающему в себя введение млекопитающему соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно некоторым вариантам осуществления воспалительное кожное заболевание представляет

собой атопический дерматит. Согласно некоторым вариантам осуществления атопический дерматит характеризуется легкой и умеренной степенью выраженности. Согласно некоторым вариантам осуществления, атопический дерматит характеризуется умеренной и тяжелой степенью выраженности.

Согласно некоторым вариантам осуществления, аутоиммунное кожное заболевание представляет собой гнездную алопецию.

Соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль также можно использовать в комбинации с одним или несколькими соединениями, применимыми для лечения воспалительных заболеваний кожи. Согласно некоторым вариантам осуществления, одно или несколько соединений представляют собой стероид, кортикостероид, антибиотик, антагонист гистаминового рецептора H1, ингибитор кальциневрина, антагонист IL-13, ингибитор PDE 4, антагонист связанного с G-белком рецептора 44, антагонист IL-4, антагонист рецептора 5-HT1a, антагонист рецептора 5-HT2b, агонист альфа-2-адренорецептора, антагонист каннабиноидного рецептора CB1, антагонист хемокина CCR3, ингибитор коллагеназы, ингибитор цитозольной фосфолипазы A2, ингибитор лиганда эотаксина, ингибитор фактора транскрипции GATA 3, ингибитор гистаминового рецептора H4, антагонист IL-10, антагонист IL-12, антагонист IL-17, антагонист IL-2, антагонист IL-23, модулятор рецептора IL-4, антагонист IL-15, антагонист IL-6, антагонист IL-8, антагонист IL-9, антагонист IL-5, антагонист иммуноглобулина E, модулятор иммуноглобулина E, антагонист рецептора гамма-интерферона, лиганд гамма-интерферона, ингибитор лиганда интерлейкина 33, антагонист рецептора интерлейкина-31, антагонист лейкотриена, агонист печеночного рецептора X бета, ингибитор ядерного фактора каппа-B, антагонист рецептора OX-40, антагонист PGD2, ингибитор фосфолипазы A2, стимулятор домена SH2 инозитолфосфатазы 1, ингибитор лиганда тимического стромального лимфопротейна, модулятор TLR, модулятор лиганда TNF альфа, стимулятор гена TLR9, стимулятор белка-4 цитотоксических лимфоцитов, агонист опиоидного рецептора каппа, ингибитор галектина-3, ингибитор гистондеацетилазы-1, ингибитор гистондеацетилазы-2, ингибитор гистондеацетилазы-3, ингибитор гистондеацетилазы-6, ингибитор гистондеацетилазы, агонист глюкокортикоидов, ингибитор тирозинкиназы Syk, антагонист рецептора TrkA, антагонист интегрин альфа-4/бета-1, антагонист интерлейкин-1-подобного рецептора, ингибитор интерлейкин-1-превращающего фермента, антагонист рецептора интерлейкина-31, ингибитор потенциалзависимого калиевого канала KCNA-3, ингибитор гена PDE4B, ингибитор калликреина 2, агонист рецептора-1 сфингозин-1-фосфата, стимулятор белка пигментного эпителия сетчатки, ингибиторе гликопротеина CD28 Т-клеточной поверхности, антагонист TGF бета или антагонист ваниллоидного VR1.

Согласно некоторым вариантам осуществления соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с бетаметазоном, фузидовой кислотой, GR-MD-02, дупилумабом, розипторацетатом, AS-101, циклоспорином, IMD-0354, секукинумабом, Актиммуном, лебрикизумабом, CMP-001, меполизумабом, пегкантиратинибом, тезепелумабом, MM-36, кризаборолом, ALX-101, бертилимумабом, FB-825, AX-1602, BNZ-1, абатацептом, такролимусом, ANB-020, JTE-052, ZPL-389, устекинумабом, GBR-830, GSK-3772847, ASN-002, реметиностабом, апремиластом, тимапипрантом, MOR-106, асиватрепом, немолизумабом, февипипрантом, доксициклином, MDPK-67b, дезлоратадином, трамолинумабом, фексофенадином, пимекролимусом, бепотастином, налфурафином, VTP-38543, Q-301, лигелизумабом, RVT-201, DMT-210, KPI-150, AKP-11, E-6005, AMG-0101, AVX-001, PG-102, ZPL-521, MEDI-9314, AM-1030, WOL-071007, MT-0814, валератом бетаметазона, SB-011, эпинастином, такролимусом, траниластом или виромедом, или любой их комбинацией.

Согласно некоторым вариантам осуществления соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации со стероидом, антибиотиком или увлажнителем (Lakhani et al., *Pediatric Dermatology*, 2017, 34, 3, 322-325). Согласно некоторым вариантам осуществления одно или несколько соединений представляют собой грамположительный антибиотик, такой как мупиноцин или фузидовая кислота.

Соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль также могут быть использованы в комбинации с грамположительными антибиотиками, такими как мупиноцин и фузидовая кислота, для лечения воспалительного кожного заболевания. Поэтому согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения воспалительного кожного заболевания у млекопитающего, причем способ включает в себя нанесение соединения согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли и грамположительного антибиотика на кожу млекопитающего. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль, грамположительный антибиотик и фармацевтически приемлемый носитель.

Поэтому согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к терапевтической комбинации для применения при лечении кожных воспалительных нарушений, причем комбинация включает в себя соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль и одно или несколько других терапевтических средств, применимых для лечения кожных воспалительных нарушений. Вторичное(ые) средство(а), при наличии, присутствуют в терапевтически эффективном количестве, то есть в любом количестве, которое обеспечивает терапевтически благоприятный эффект при совместном введении с соединением (I) или его фармацевтически приемлемой солью.

Поэтому также предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль и одно или несколько других терапевтических средств, применимых для лечения кожных воспалительных нарушений.

Кроме того, согласно аспекту, связанному со способом, настоящее изобретение относится к способу лечения кожных воспалительных нарушений, причем способ включает в себя введение млекопитающему соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли и одно или несколько других терапевтических средств, применимых для лечения кожных воспалительных нарушений.

#### **Желудочно-кишечное воспалительное заболевание**

Вследствие ингибирования ферментов семейства JAK предполагается, что соединение (I) будет применимо для целого ряда желудочно-кишечных воспалительных показаний, которые включают в себя без ограничения язвенный колит (проктосигмоидит, панколит, язвенный проктит и левосторонний колит), болезнь Крона, коллагенозный колит, лимфоцитарный колит, болезнь Бехчета, целиакию, колит, индуцированный ингибиторами контрольных точек иммунитета, илеит, эозинофильный эзофагит, колит, связанный с реакцией "трансплантат-против-хозяина", и инфекционный колит. Язвенный колит (Reimund et al., J Clin Immunology, 1996, 16, 144-150), болезнь Крона (Woywodt et al., Eur J Gastroenterology Hepatology, 1999, 11, 267-276), коллагенозный колит (Kumawat et al., Mol Immunology, 2013, 55, 355-364), лимфоцитарный колит (Kumawat et al., 2013), эозинофильный эзофагит (Weinbrand-Goichberg et al., Immunol Res, 2013, 56, 249-260), колит, связанный с реакцией "трансплантат-против-хозяина" (Coghill et al., Blood, 2001, 117, 3268-3276), инфекционный колит (Stallmach et al., Int J Colorectal Dis, 2004, 19, 308-315), болезнь Бехчета (Zhou et al., Autoimmun Rev, 2012, 11, 699-704), целиакия (de Nitto et al., World J Gastroenterol, 2009, 15, 4609-4614), колит, индуцированный ингибиторами иммунных контрольных точек (например, колит, индуцированный ингибитором CTLA-4 (Yano et al., J Translation Med, 2014, 12, 191), колит, индуцированный ингибитором PD-1-или PD-L1) и илеит (Yamamoto et al., Dig liver Dis, 2008, 40, 253-259) характеризуются повышением содержания определенных провоспалительных цитокинов. Поскольку многие провоспалительные цитокины передают сигналы посредством активации JAK, описанные в настоящей заявке соединения могут быть способны смягчать воспаление и обеспечивать ослабление симптомов.

Поэтому согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способу лечения желудочно-кишечного воспалительного заболевания у млекопитающего (например, человека), включающему в себя введение млекопитающему фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способу лечения желудочно-кишечного воспалительного заболевания у млекопитающего (например, человека), включающему в себя введение млекопитающему соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения язвенного колита у млекопитающего, причем способ включает в себя введение млекопитающему соединения согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и соединение согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль.

При использовании для лечения язвенного колита соединения согласно настоящему изобретению обычно вводят перорально в виде одной суточной дозы или в виде нескольких доз в течение суток, хотя могут использоваться другие формы введения. Количество действующего вещества, вводимого в одной дозе, или общее количество, вводимое в течение суток, обычно определяется врачом в свете соответствующих обстоятельств, включающих в себя подлежащее лечению состояние, выбранный путь введения, конкретное вводимое соединение и его относительную активность, возраст, массу тела и ответ конкретного пациента, тяжесть симптомов пациента и т.п.

Предполагается, что для человека со средней массой тела 70 кг подходящие дозы для лечения язвенного колита и других желудочно-кишечных воспалительных заболеваний будут варьировать приблизительно от 1 приблизительно до 400 мг/сутки действующего вещества, включая приблизительно от 5 приблизительно до 300 мг/сутки и приблизительно от 20 приблизительно до 70 мг/сутки действующего вещества.

Соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль также могут быть использованы в комбинации с одним или несколькими средствами, которые действуют по тому же механизму или по другим механизмам при лечении желудочно-кишечных воспалительных нарушений. Применимые классы средств для комбинированной терапии включают в себя без ограничения аminosалицилаты, стероиды, системные иммуносупрессанты, антитела против TNF $\alpha$ , антитела против VLA-4, антитела против интегрина  $\alpha_4\beta_7$ , антибактериальные средства и лекарственные средства от диареи.

Аminosалицилаты, которые могут быть использованы в комбинации с соединением (I), включают в себя без ограничения мезаламин, осалазин и сульфасалазин. Примеры стероидов включают в себя без ограничения преднизон, преднизолон, гидрокортизон, будесонид, беклометазон и флутиказон. Системные иммуносупрессанты, применимые для лечения воспалительных заболеваний, включают в себя без

ограничения циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, 6-меркаптопурин и такролимус. Кроме того, в комбинированной терапии можно использовать антитела против TNF $\alpha$ , которые включают в себя без ограничения инфликсимаб, адалимумаб, голимумаб и цертолизумаб. Применимые соединения, действующие по другим механизмам действия, включают в себя антитела против VLA-4, такие как натализумаб, антитела против интегрина  $\alpha_4\beta_7$ , такие как ведолизумаб, антибактериальные средства, такие как рифаксимин, и лекарственные средства от диареи, такие как лоперамид (Mozaffari et al., Expert, Biol. Ther. 2014, 14, 583-600, Danese, Gut, 2012, 61, 918-932, Lam et al., Immunotherapy, 2014, 6, 963-971).

Поэтому согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к терапевтической комбинации для применения при лечении желудочно-кишечных воспалительных нарушений, причем комбинация включает в себя соединение согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль и одно или несколько других терапевтических средств, применимых для лечения желудочно-кишечных воспалительных нарушений. Например, изобретение относится к комбинации, включающей в себя соединение согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль и одно или несколько средств, выбранных из аminosалицилатов, стероидов, системных иммуносупрессантов, антител против TNF $\alpha$ , антител против VLA-4, антитела против интегрина  $\alpha_4\beta_7$ , антибактериальных средств и лекарственных средств от диареи. Дополнительное(ые) средство(а) при наличии присутствует(ют) в терапевтически эффективном количестве, то есть в любом количестве, которое обеспечивает терапевтически благоприятный эффект при совместном введении с соединением согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой солью.

Поэтому также предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль и одно или несколько других терапевтических средств, применимых для лечения желудочно-кишечных воспалительных нарушений.

Кроме того, согласно одному аспекту, относящемуся к способу, настоящее изобретение относится к способу лечения желудочно-кишечных воспалительных нарушений, включающему в себя введение млекопитающему соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли и одного или нескольких других терапевтических средств, применимых для лечения желудочно-кишечных воспалительных нарушений.

### Респираторные заболевания

Цитокины, которые передают сигналы через путь JAK-STAT, в частности IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-13, IL-23, IL-31, IL-27, тимусный стромальный лимфопоэтин (TSLP), интерферон- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), вовлечены в воспалении при астме и других воспалительных респираторных заболеваниях. Как описано выше, было показано, что соединение (I) является мощным ингибитором киназ JAK и демонстрирует эффективное ингибирование провоспалительных цитокинов IL-13 в клеточных методах анализа.

Противовоспалительная активность ингибиторов JAK была надежно продемонстрирована на доклинических моделях астмы (Malaviya et al., Int Immunopharmacol, 2010, 10, 829-836; Matsunaga et al., Biochem and Biophys Res Commun, 2011, 404, 261-267; Kudlacz et al., Eur J Pharmacol, 2008, 582, 154-161.) Соответственно предполагается, что соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль могут быть применимы для лечения воспалительных респираторных нарушений, таких как астма. В дополнение к астме, воспаление и фиброз легких характерны для других респираторных заболеваний, таких как хроническая обструктивная болезнь легких (COPD), муковисцидоз (CF), пневмонит, интерстициальные заболевания легких (включая идиопатический легочный фиброз), острое повреждение легких, острый респираторный дистресс-синдром, бронхит, эмфизема и облитерирующий бронхиолит. Поэтому соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль могут быть применимы для лечения хронической обструктивной болезни легких, муковисцидоза, пневмонита, интерстициальных заболеваний легких (включая идиопатический легочный фиброз), острого повреждения легких, острого респираторного дистресс-синдрома, бронхита, эмфиземы, облитерирующего бронхиолита, хронической дисфункции аллотрансплантата легкого (CLAD), отторжения трансплантата легкого и саркоидоза.

Поэтому согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способу лечения респираторного заболевания у млекопитающего (например, человека), включающему в себя введение млекопитающему соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно одному аспекту респираторное заболевание представляет собой астму, хроническую обструктивную болезнь легких, муковисцидоз, пневмонит, хроническую обструктивную болезнь легких (COPD), муковисцидоз (CF), пневмонит, интерстициальные заболевания легких (включая идиопатический легочный фиброз), острое повреждение легких, острый респираторный дистресс-синдром, бронхит, эмфизему, облитерирующий бронхиолит, аллергический ринит или саркоидоз. Согласно одному аспекту респираторное заболевание представляет собой астму или хроническое обструктивное заболевание легких.

Согласно другому аспекту респираторное заболевание представляет собой легочную инфекцию, гельминтную инфекцию, легочную артериальную гипертензию, саркоидоз, лимфангиолейомиоматоз, бронхоэктаз или инфильтративное заболевание легких. Согласно еще одному аспекту респираторное

заболевание представляет собой пневмонит, вызванный лекарственными средствами, пневмонит, вызванный грибами, аллергический бронхолегочный аспергиллез, пневмонит при гиперчувствительности, эозинофильный гранулематоз с полиангиитом, идиопатическая острая эозинофильная пневмония, идиопатическая хроническая эозинофильная пневмония, гиперэозинофильный синдром, синдром Леффлера, облитерирующий бронхиолит с организующейся пневмонией или пневмонит, индуцированный ингибитором контрольной точки иммунитета.

Настоящее раскрытие дополнительно относится к способу лечения респираторного заболевания, причем способ включает в себя введение млекопитающему фармацевтической композиции, содержащей соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель.

Соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль также могут быть использованы в комбинации с одним или несколькими соединениями, применимыми для респираторных заболеваний.

#### **Глазные заболевания**

Многие глазные заболевания ассоциированы с повышением содержания провоспалительных цитокинов, которые относятся к пути передачи сигналов JAK-STAT.

Поэтому соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль могут быть использованы для лечения целого ряда глазных заболеваний, которые включают в себя без ограничения увеит, диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, синдром сухого глаза, возрастную макулярную дегенерацию и атопический кератоконъюнктивит.

В частности, увеит (Horai and Caspi, J Interferon Cytokine Res, 2011, 31, 733-744), диабетическая ретинопатия (Abcouwer, J Clin Cell Immunol, 2013, Suppl 1, 1-12), диабетический макулярный отек (Sohn et al., American Journal of Ophthalmology, 2011, 152, 686-694), синдром сухого глаза (Stevenson et al., Arch Ophthalmol, 2012, 130, 90-100) окклюзия вен сетчатки (Shchuko et al., Indian Journal of Ophthalmology, 2015, 63(12), 905-911) и возрастная макулярная дегенерация (Knickerbein et al., Int Ophthalmol Clin., 2015, 55(3), 63-78) характеризуются повышением содержания определенных провоспалительных цитокинов, которые передают сигнал по пути JAK-STAT. Соответственно соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль могут быть способны смягчать симптомы ассоциированного воспаления глаза и обращать развитие заболевания или обеспечивать ослабление симптомов.

Поэтому согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения глазного заболевания у млекопитающего, включающему в себя введение в глаз млекопитающего соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, содержащей соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтический носитель. Согласно одному аспекту глазное заболевание представляет собой увеит, диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, синдром сухого глаза, возрастную макулярную дегенерацию или атопический кератоконъюнктивит. Согласно одному аспекту способ включает в себя введение соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли посредством инъекции в стекловидное тело.

Соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль также могут быть использованы в комбинации с одним или несколькими соединениями, применимыми для глазных заболеваний.

#### **Другие заболевания**

Соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль также могут быть применимы для лечения других заболеваний, таких как воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания и злокачественные опухоли.

Соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль также могут быть применимы для лечения ротовой полости, мукозита слизистой оболочки полости рта и рецидивирующего афтозного стоматита.

Соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль также могут быть применимы для лечения одного или нескольких из артрита, ревматоидного артрита, ювенильного ревматоидного артрита, отторжения трансплантата, ксерофтальмии, псориатического артрита, диабета, инсулинозависимого диабета, болезни двигательных нейронов, миелодиспластического синдрома, боли, саркопении, кахексии, септического шока, системной красной волчанки, лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелолейкоза, острого лимфобластного лейкоза, острого миелобластного лейкоза, анкилозирующего спондилита, миелофиброза, В-клеточной лимфомы, гепатоцеллюлярного рака, болезни Ходжкина, злокачественной опухоли молочной железы, множественной миеломы, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легкого, светлоклеточного рака яичников, опухоли яичника, опухоли поджелудочной железы, истинной полицитемии, синдрома Шегрена, саркомы мягких тканей, саркомы, спленоmegалии, Т-клеточной лимфомы и большой талассемии.

Настоящее раскрытие относится к способу лечения указанных заболеваний у млекопитающего, включающему в себя введение млекопитающему соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, содержащей соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтический носитель.

В предшествующих параграфах в случае применения при комбинированной терапии средства могут быть включены в состав единой фармацевтической композиции, раскрытой выше, или средства могут быть предоставлены в отдельных композициях, которые вводят одновременно или в разное время, одним

и тем же или разными путями введения. При раздельном введении средства вводят достаточно близко по времени с тем, чтобы обеспечить целевой терапевтический эффект. Такие композиции могут быть упакованы по отдельности или могут быть упакованы вместе в виде набора. Два или несколько терапевтических средств в наборе могут быть введены одним и тем же путем введения или различными путями введения.

### Примеры

Последующие примеры синтеза и биологические примеры предложены для иллюстрации настоящего изобретения и никоим образом не должны истолковываться как ограничивающие объем настоящего изобретения. В представленных ниже примерах, если не указано иное, то следующие сокращения имеют следующие значения. Сокращения, не указанные ниже, имеют их общепринятые значения.

ACN - ацетонитрил  
 Bn - бензил  
 Boc - трет-бутоксикарбонил  
 сут - сутки (суток)  
 DIPEA - N,N-диизопропилэтиламин  
 DMF - N,N-диметилформамид  
 DMSO - диметилсульфоксид  
 EtOAc - этилацетат  
 EtOH - этиловый спирт  
 ч - час (часы)  
 HATU - N,N,N',N'-тетраметил-O-(7-азабензотриазол-1-ил)урония гексафторфосфат  
 IPA - изопропиловый спирт  
 MeOH - метанол  
 мин - минута (минуты)  
 NMP - N-метилпирролидон  
 к.т. - комнатная температура  
 TEA - триэтиламин  
 THF - тетрагидрофуран  
 TFA - трифторуксусная кислота

Реагенты и растворители приобретали у коммерческих поставщиков (Aldrich, Fluka, Sigma, и т.д.) и использовали без дополнительной очистки. Развитие реакций отслеживали методом тонкослойной хроматографии (TLC), аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (анал. HPLC) и/или масс-спектрометрии. Выделение продуктов из реакционных смесей проводили, как более определенно описано для каждой реакции; главным образом, их очищали путем экстрагирования или другими способами очистки, такими как зависимость от температуры и зависимость от растворителя кристаллизация и осаждение. Кроме того, реакционные смеси рутинно очищали методом колоночной хроматографии или методом препаративной HPLC, обычно с использованием колонок с набивкой C18 или BDS сорбентом и традиционных элюентов. Типичные условия препаративной HPLC описаны ниже.

Охарактеризацию продуктов реакции рутинно проводили методами масс- и <sup>1</sup>H-ЯМР-спектрометрии. Для ЯМР-анализа образцы растворяли в дейтерированном растворителе (таком как CD<sub>3</sub>OD, CDCl<sub>3</sub> или d<sub>6</sub>-DMSO) и получали спектры <sup>1</sup>H-ЯМР с использованием прибора Varian Gemini 2000 (400 МГц) в стандартных условиях наблюдения. Масс-спектрометрическую идентификацию соединений проводили методом ионизации электропылением (ESMS) на приборе Applied Biosystems (Foster City, CA) model API 150 EX или Waters (Milford, MA) 3100, соединенном с системами автоочистки.

Если не указано иное, то для препаративной HPLC очистки использовали следующие условия.

Колонка: C18, 5 мкм, 21,2×150 мм, или C18, 5 мкм, 21×250 мм, или C14, 5 мкм, 21×250 мм

Температура колонки: комнатная температура

Скорость потока: 20,0 мл/мин

Подвижные фазы: A=вода+0,05% TFA; B=ACN+0,05% TFA

Вводимый объем: (100-1500 мкл)

Длина волны детектора: 214 нм

Неочищенные соединения растворяли в смеси вода:уксусная кислота=1:1 приблизительно до 50 мг/мл. Проводили аналитический тестовый прогон в течение 4 мин с использованием C18 колонки 2,1×50 мм, а затем препаративный анализ в течение 15 или 20 мин с использованием вводимого объема 100 мкл и градиента, основанного на зависимости от % B удерживании при аналитическом тестовом прогоне. Точные градиенты зависели от образца. Образцы с близко элюируемыми примесями проверяли на C18 колонке 21×250 мм и/или C14 колонке 21×150 мм для лучшего разделения. Фракции, содержащие целевой продукт, идентифицировали методом масс-спектрометрического анализа.

### Условия аналитической HPLC

Способ A:

Колонка: LUNA C18 (2), 150×4,60 мм, 3 мкм

Температура колонки: 37°C

Скорость потока: 1,0 мл/мин

Вводимый объем: 5 мкл

Подготовка образца: растворение в смеси ACN:вода=1:1

Подвижные фазы: А=вода:ACN:TFA (98:2:0,05), В=вода:ACN:TFA (2:98:0,05)

Длина волны детектора: 250 нм

Градиент: всего 32 мин (время (мин)/% В): 0/2, 10/20, 24/90, 29/90, 30/2, 32/2

Способ В:

Колонка: LUNA C18 (2), 150×4,60 мм, 3 мкм

Температура колонки: 37°C

Скорость потока: 1,0 мл/мин

Вводимый объем: 10 мкл

Подготовка образца: растворение в смеси ACN:вода=1:1

Подвижные фазы: А=вода:ACN:TFA (98:2:0,05), В=вода:ACN:TFA (10:90:0,05)

Длина волны детектора: 254 нм

Градиент: всего 35 мин (время (мин)/% В): 0/2, 20/25, 23/90, 26/90, 27/2, 35/2

Способ С:

Колонка: Poroshell 120 SB-Aq, 150×4,60 мм, 2,7 мкм, кат. #683975-914

Температура колонки: 35°C

Скорость потока: 1,0 мл/мин

Вводимый объем: 5 мкл

Подготовка образца: растворение в смеси МРВ:МРА=50:50

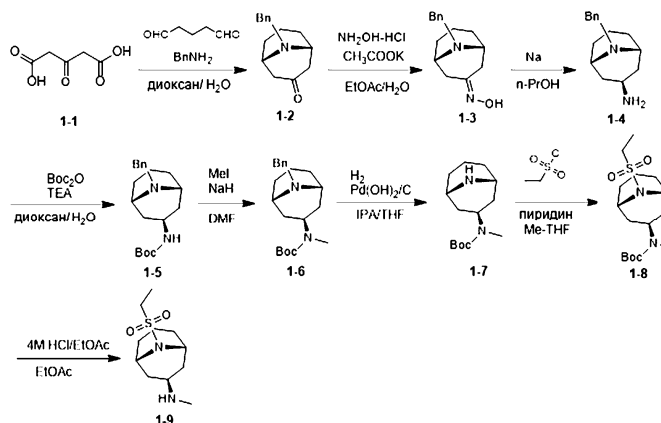
Подвижные фазы: А=ацетонитрил:вода:трифторуксусная кислота (1:99:0,20),

В=ацетонитрил:вода:трифторуксусная кислота (90:10:0,20)

Градиент:

| Время, мин | %А   | %В    |
|------------|------|-------|
| 0,0        | 98,0 | 2,0   |
| 16,0       | 40,0 | 60,0  |
| 22,0       | 0,0  | 100,0 |
| 25,0       | 0,0  | 100,0 |
| 25,1       | 98,0 | 2,0   |
| 30,0       | 98,0 | 2,0   |

Получение 1: трет-бутил-((1R,3s,5S)-9-(этилсульфонил)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)(метил)карбамат



Стадия 1:

В параллели ставили пять реакций. К раствору соединения 1-1 (2,00 кг, 13,7 моль, 1,00 экв.) в диоксане (5,00 л) и воде (20,0 л) при 10°C по каплям добавляли глутаральдегид (2,06 кг, 20,5 моль, 1,5 экв.) и фенилметанамин (1,54 кг, 14,4 моль, 1,05 экв.). После добавления реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 16 ч. Методами TLC (петroleumный эфир/этилацетат=5/1, продукт R<sub>f</sub>=0,40) и LCMS обнаруживали завершение реакции. Значение pH реакционной смеси корректировали до pH 2 добавлением концентрированной HCl (12н) при 20°C. После добавления реакционную смесь нагревали до 60°C и перемешивали в течение 1 ч. После охлаждения до 10°C к смеси добавляли этилацетат (10,0 л). Затем значение pH смеси корректировали до pH 10 добавлением водного раствора гидроксида натрия (12н) при 10°C. Смесь перемешивали в течение 10 мин. Органический слой разделяли. Водный слой экстрагировали этилацетатом (3,00 л). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (4,00 л), сушили над сульфатом натрия и фильтровали. Органический слой от пяти параллельных реакций объеди-

няли и концентрировали. Остаток очищали методом колоночной хроматографии ( $\text{SiO}_2$ , петролейный эфир/этилацетат=30/1-2/1) с получением соединения 1-2 (10,0 кг, выход 51,5%, чистота 97%). (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  рассчит. для  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}$  230,15 обнаруж. 230,0.

$^1\text{H}$ -ЯМР: 400 МГц  $\text{DMSO-d}_6$   $\delta$  7,24-7,41 (м, 5H), 3,88 (с, 2H), 3,20-3,21 (м, 2H), 2,73-2,79 (м, 2H), 2,07 (д,  $J=16,4$  Гц, 2H), 1,75-1,84 (м, 2H), 1,45-1,50 (м, 3H), 1,24-1,36 (м, 1H).

#### Стадия 2:

В параллели ставили три реакции. К раствору соединения 1-2 (3,00 кг, 13,1 моль, 1,0 экв.) в этилацетате (24,0 л) и воде (9,00 л) при 20°C добавляли  $\text{CH}_3\text{COOK}$  (2,05 кг, 20,9 моль, 1,6 экв.) и  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  (1,82 кг, 26,2 моль, 2,0 экв.). Суспензию нагревали до 45°C и перемешивали в течение 16 ч. Методами TLC (петролейный эфир/этилацетат=2/1, продукт  $R_f=0,30$ ) и LCMS обнаруживали завершение реакции. Значение pH суспензии корректировали до pH 8 добавлением насыщенного водного раствора бикарбоната натрия, а затем разбавляли водой (15,0 л) и этилацетатом (10,0 л). Органический слой разделяли. Водный слой экстрагировали этилацетатом (3×10,0 л). Органический слой от трех реакционных смесей объединяли, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт разбавляли н-гептаном (12,0 л) и перемешивали в течение 12 ч. Твердое вещество собирали путем фильтрации с получением соединения 1-3 (8,00 кг, выход 83,4%). (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  рассчит. для  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$  245,16 обнаруж. 245,1.

$^1\text{H}$ -ЯМР: 400 МГц  $\text{DMSO-d}_6$  10,16 (с, 1H), 7,22-7,38 (м, 5H), 3,83 (с, 2H), 2,97 (ушир. с, 2H), 2,87 (д,  $J=16,0$  Гц, 1H), 2,60-2,62 (м, 1H), 2,20-2,25 (м, 1H), 2,09-2,13 (м, 1H), 1,72-1,85 (м, 3H), 1,39-1,49 (м, 3H).

#### Стадия 4:

В параллели ставили сорок пять реакций. К раствору соединения 1-3 (160 г, 655 ммоль, 1,0 экв.) в n-PrOH (3,20 л) при 110°C в течение 3 ч порциями добавляли Na (181 г, 7,86 моль, 12 экв.). Смесь перемешивали при 110°C в течение 2 ч. Методом TLC (петролейный эфир/этилацетат=2/1, исходное вещество  $R_f=0,40$ ) обнаруживали завершение реакции. Смесь охлаждали до 70°C, вливали в воду со льдом (4,00 л). Водный слой экстрагировали этилацетатом (2×1,0 л). Объединенный органический слой от сорока пяти реакционных смесей промывали солевым раствором (20,0 л), сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Остаток разбавляли н-гексаном (12,0 л), перемешивали в течение 12 ч. Суспензию фильтровали с получением фильтрата. Фильтрат концентрировали с получением соединения 1-4 (6,00 кг, выход 88,4%) в виде желтого масла.

$^1\text{H}$ -ЯМР 400 МГц  $\text{DMSO-d}_6$ :  $\delta$  7,18-7,35 (м, 5H), 3,76 (с, 2H), 3,26-3,35 (м, 1H), 2,76 (с, 2H), 1,86-1,90 (м, 2H), 1,67-1,73 (м, 2H), 1,54-1,59 (м, 5H), 1,41-1,45 (м, 3H).

#### Стадия 5:

В параллели ставили две реакции. К раствору соединения 1-4 (2,10 кг, 9,12 моль, 1,1 экв.) в диоксане (12,6 л) и воде (1,26 л) при 0°C по каплям добавляли  $\text{Et}_3\text{N}$  (1,01 кг, 10,0 моль, 1,1 экв.) и  $(\text{Voc})_2\text{O}$  (2,19 кг, 10,0 моль, 1,1 экв.), поддерживая температуру ниже 20°C. Смесь нагревали до 40°C и перемешивали в течение 10 ч. Методом TLC (петролейный эфир/этилацетат=2/1, продукт  $R_f=0,40$ ) обнаруживали завершение реакции. Смесь охлаждали до 10°C, фильтровали с получением осадка на фильтре. Фильтрат концентрировали. Осадок на фильтре промывали н-гексаном (3,00 л) с получением соединения 1-5 (4,00 кг, выход 66,4%) в виде белого твердого вещества.

$^1\text{H}$ -ЯМР: 400 МГц  $\text{DMSO-d}_6$ :  $\delta$  7,28-7,33 (м, 4H), 7,19-7,22 (м, 1H), 6,64 (д,  $J=8,0$  Гц, 1H), 4,10-4,17 (м, 1H), 3,77 (с, 2H), 2,77 (с, 2H), 1,88-1,90 (м, 2H), 1,72-1,75 (м, 3H), 1,57-1,61 (м, 3H), 1,43-1,48 (м, 2H), 1,38 (с, 9H).

#### Стадия 6:

В параллели ставили четыре реакции. К суспензии соединения 1-5 (1,50 кг, 4,54 моль, 1,0 экв.) в DMF (13,5 л) в атмосфере  $\text{N}_2$  при 0°C порциями добавляли NaH (272 г, 6,81 моль, чистота 60%, 1,5 экв.). Суспензию нагревали естественным образом до 25°C и перемешивали в течение 30 мин. После охлаждения до 0°C к суспензии по каплям добавляли MeI (773 г, 5,45 моль, 1,2 экв.). Реакционную смесь нагревали естественным образом до 25°C и перемешивали в течение 12 ч. Методами TLC (петролейный эфир/этилацетат=5/1, продукт  $R_f=0,50$ ) и LCMS обнаруживали завершение реакции. Смесь вливали в воду со льдом (30,0 л), экстрагировали этилацетатом (9,00 л, 3,00 л).

Объединенный органический слой от четырех реакционных смесей промывали водой со льдом (20,0 л), солевым раствором (10,0 л), сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали с получением соединения 1-6 (6,00 кг, неочищ.) в виде желтого масла. Неочищенный продукт использовали на следующей стадии.

$^1\text{H}$ -ЯМР: 400 МГц  $\text{DMSO-d}_6$   $\delta$  7,21-7,37 (м, 5H), 4,87 (ушир. с, 1H), 3,80 (с, 2H), 2,86 (с, 2H), 2,68 (с, 3H), 1,64-1,99 (м, 6H), 1,40-1,49 (м, 13H). (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  рассчит. для  $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_2$  344,25 обнаруж. 345,2.

#### Стадия 7:

В параллели ставили тридцать девять реакций. К раствору соединения 1-6 (150 г, 435 ммоль, 1,0 экв.) в IPA (500 мл) и THF (500 мл) добавляли  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$  (70 г, чистота 40%). Суспензию несколько раз дегазировали в условиях вакуума и продували  $\text{H}_2$ . Смесь перемешивали в атмосфере  $\text{H}_2$  (50 фунт./кв.дюйм) при 25°C в течение 16 ч. Методами TLC (петролейный эфир/этилацетат=5/1, исходное

вещество  $R_f=0,50$ ) и LCMS обнаруживали завершение реакции. Собирали тридцать девять реакционных смесей. Смесь фильтровали с получением фильтрата. Осадок на фильтре промывали IPA/THF (1/1, 25,0 л). Объединенный фильтрат концентрировали с получением соединения 1-7 (3,85 кг, неочищ.) в виде светло-желтого масла. Неочищенный продукт использовали непосредственно на следующей стадии. (m/z):  $[M+H]^+$  рассчит. для  $C_{14}H_{26}N_2O_2$  255,20 обнаруж. 255,1.

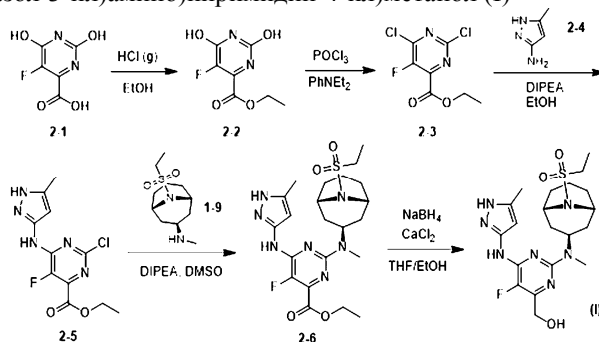
$^1H$ -ЯМР: 400 МГц DMSO- $d_6$   $\delta$  4,88 (ушир. с, 1H), 3,08 (с, 2H), 2,60 (с, 3H), 1,73-1,76 (м, 5H), 1,51-1,61 (м, 5H), 1,39 (с, 9H).

Стадия 8: В параллели ставили четыре реакции. К раствору соединения 1-7 (750 г, 2,95 моль, 1,0 экв.) в 2-метилтетрагидрофуране (3,00 л) в атмосфере  $N_2$  при 0°C по каплям добавляли пиридин (466 г, 5,90 моль, 2,0 экв.) и этансульфонилхлорид (398 г, 3,10 моль, 1,05 экв.). Смесь нагревали до 25°C и перемешивали в течение 3 ч. Методом TLC (петролейный эфир/этилацетат=2/1, продукт  $R_f=0,50$ ) обнаруживали завершение реакции. Собирали четыре реакционные смеси. Смесь гасили добавлением водой со льдом (10,0 л). Органический слой разделяли, промывали 0,5N HCl (2×3,00 л). Объединенный водный слой экстрагировали этилацетатом (3,00 л), органический слой снова промывали 0,5N HCl (500 мл). Объединенный органический слой промывали соевым раствором (5,00 л), сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали с получением соединения 1-8 (2,20 кг, неочищ.) в виде желтого масла. Неочищенный продукт использовали на следующей стадии.  $^1H$ -ЯМР: 400 МГц DMSO- $d_6$   $\delta$  4,94 (ушир. с, 1H), 3,98 (с, 2H), 3,10 (кв, J=7,2 Гц, 2H), 2,58 (с, 3H), 1,83-1,91 (м, 5H), 1,56-1,71 (м, 5H), 1,40 (с, 9H), 1,19 (т, J=7,2 Гц, 3H).

Стадия 9: В параллели ставили четыре реакции. К раствору соединения 1-8 (550 г, 1,59 моль, 1,0 экв.) в EtOAc (2,75 л) при 25°C по каплям добавляли HCl/EtOAc (4 М, 3,0 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 12 ч. Методом TLC (петролейный эфир/этилацетат=2/1, исходное вещество  $R_f=0,50$ ) обнаруживали завершение реакции. Собирали четыре реакционные смеси. Смесь фильтровали с получением осадка на фильтре с получением соединения 1-9 (1,25 кг, неочищ., HCl) в виде желтого твердого вещества.

$^1H$ -ЯМР: 400 МГц DMSO- $d_6$   $\delta$  9,04 (с, 1H), 4,02 (с, 2H), 3,88-3,94 (м, 1H), 3,09 (кв, J=7,2 Гц, 2H), 2,09-2,14 (м, 2H), 1,61-1,84 (м, 8H), 1,19 (т, J=7,2 Гц, 3H).

Получение 2: (2-(((1R,3S,5S)-9-(этилсульфонил)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)(метил)амино)-5-фтор-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-4-ил)метанол (I)



Стадия 1:

Раствор соединения 2-1 (1,00 кг, 5,74 моль, 1,0 экв.) в этаноле (15,0 л) с насыщенной HCl (1,40 кг, 38,4 моль) перемешивали при 90°C в течение 60 ч. Методом HPLC обнаруживали один детектируемый основной пик. Реакционную смесь фильтровали. Осадок на фильтре собирали с получением соединения 2-2 (1,00 кг, выход 81,8%, чистота 98,8%) в виде белого твердого вещества.

$^1H$ -ЯМР: 400 МГц DMSO- $d_6$   $\delta$  11,82 (ушир. с, 1H), 10,82 (ушир. с, 1H), 4,31 (кв, J=7,2 Гц, 2H), 1,27 (т, J=6,8 Гц, 3H).

Стадия 2:

В параллели ставили пять реакций. К раствору соединения 2-2 (560 г, 2,77 моль, 1,0 экв.) в  $POCl_3$  (1,68 л) добавляли N,N-диэтиланилин (289 г, 1,94 моль, 0,7 экв.). Смесь перемешивали при 140°C в течение 12 ч. Методом TLC (петролейный эфир/этилацетат=10/1, продукт  $R_f=0,50$ ) обнаруживали полное расходование соединения 2-2. Собирали пять реакционных смесей. Реакционную смесь концентрировали в условиях пониженного давления с получением остатка. Остаток разбавляли этилацетатом (25,0 л). Раствор вливали в колотый лед (25,0 л). Водный фазу экстрагировали этилацетатом (25,0 л). Объединенные органические слои промывали насыщенным раствором карбоната натрия (2×10,0 л), сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в условиях пониженного давления с получением остатка. Остаток очищали методом колоночной хроматографии ( $SiO_2$ , петролейный эфир/этилацетат=1/0-50/1) с получением соединения 2-3 (2,00 кг) в виде коричневой жидкости.

$^1H$ -ЯМР: 400 МГц  $CDCl_3$   $\delta$  4,51 (кв, J=7,2 Гц, 2H), 1,44 (т, J=7,2 Гц, 3H).

Стадия 3:

В параллели ставили четыре реакции. Смесь соединения 2-3 (480 г, 2,01 моль, 1,0 экв.), соединения

2-4 (224 г, 2,31 моль, 1,15 экв.), DIPEA (519 г, 4,02 моль, 2,0 экв.) в этаноле (2,60 л) трижды дегазировали и продували  $N_2$ , а затем перемешивали смесь при 25°C в течение 4 ч в атмосфере  $N_2$ . Методом TLC (петролейный эфир/этилацетат=10/1) обнаруживали полное расходование соединения 2-3. Методом TLC (петролейный эфир/этилацетат=1/1, продукт  $R_f=0,40$ ) обнаруживали формирование одного нового пятна. Собирали четыре реакционные смеси. Реакционную смесь фильтровали, и собирали осадок на фильтре. Фильтрат концентрировали в условиях пониженного давления с получением остатка. Остаток растирали с водой (38,0 л) и фильтровали. Осадок на фильтре (300 г) растирали с этанолом (600 мл) и фильтровали. Два осадка на фильтрах собирали с получением соединения 2-5 (1,50 кг, выход 62,2%) в виде желтого твердого вещества.

$^1H$ -ЯМР: 400 МГц DMSO- $d_6$   $\delta$  12,31 (с, 1H), 10,76 (с, 1H), 6,38 (с, 1H), 4,35 (кв,  $J=7,2$  Гц, 2H), 2,27 (с, 3H), 1,30 (т,  $J=7,2$  Гц, 3H).

Стадия 4:

В параллели ставили четыре реакции. Раствор соединения 2-5 (254 г, 848 ммоль, 1,0 экв.), соединения 1-9 (300 г, 1,06 моль, HCl, 1,25 экв.) и DIPEA (548 г, 4,24 моль, 5,0 экв.) в DMSO (600 мл) перемешивали при 130°C в течение 16 ч. Методами TLC (этилацетат/петролейный эфир=2/1,  $R_f=0,30$ ) и LCMS обнаруживали, что осталось ~9% исходного вещества. Смесь охлаждали до 25°C. Четыре реакционные смеси собирали, вливали в воду со льдом (12,0 л). Формировался желтый осадок. Твердое вещество собирали путем фильтрования с получением соединения 2-6 (1,50 кг, чистота ~76%) в виде желтого твердого вещества. (m/z):  $[M+H]^+$  рассчит. для  $C_{22}H_{32}FN_7O_4S$  510,22 обнаруж. 510,2. Суспензию соединения 2-6 (440 г, 656 ммоль, чистота ~76%) в этаноле (1,10 л) нагревали до 95°C до растворения твердого вещества. Раствор охлаждали до 25°C и перемешивали в течение 12 ч. Методом HPLC обнаруживали чистоту ~96,9%. Собирали три реакционные смеси. Суспензию фильтровали с получением осадка на фильтре с получением соединения 2-6 (~570 г, 96,9% чистота) в виде светло-желтого твердого вещества. Продукт использовали непосредственно на следующей стадии.

$^1H$ -ЯМР: 400 МГц DMSO- $d_6$   $\delta$  12,12 (с, 1H), 9,73 (с, 1H), 6,35 (с, 1H), 5,59 (ушир. с, 1H), 4,32 (м, 2H), 4,02 (с, 2H), 3,13 (кв,  $J=7,2$  Гц, 2H), 2,83 (с, 3H), 2,20 (с, 3H), 1,94 (с, 3H), 1,64-1,73 (м, 5H), 1,76-1,87 (м, 5H), 1,29 (т,  $J=7,2$  Гц, 3H), 1,21 (т,  $J=7,2$  Гц, 3H).

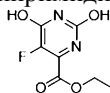
Стадия 5:

В параллели ставили пять реакций. К раствору соединения 2-6 (130 г, 255 ммоль, 1,0 экв.) в тетрагидрофуране (3,25 л) и этаноле (3,25 л) при 0°C порциями добавляли  $NaBH_4$  (77,2 г, 2,04 моль, 8,0 экв.) и  $CaCl_2$  (113 г, 1,02 моль, 4,0 экв.). Смесь нагревали до 10°C и перемешивали в течение 2 ч. Методом TLC (этилацетат/петролейный эфир=3/1, продукт  $R_f=0,20$ ) обнаруживали завершение реакции. Собирали пять реакционных смесей. Смесь гасили добавлением насыщенного раствора карбоната натрия (6,00 л), добавляли этилацетатом (15,0 л) и перемешивали в течение 0,5 ч. Суспензию фильтровали с получением фильтрата. Органический слой разделяли, и экстрагировали водный слой этилацетатом (2×5,00 л). Объединенный органический слой промывали солевым раствором (5,00 л), сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали с получением соединения (I) (500 г, неочищ.) в виде светло-желтого твердого вещества.

Очистка: В параллели ставили пять реакций. Суспензию соединения (I) (100 г, 210 ммоль) в этаноле (3,00 л) нагревали до 95°C до растворения твердого вещества. Раствор охлаждали до 25°C и перемешивали в течение 12 ч с формированием большого количества осадка. Методом HPLC обнаруживали чистоту 100%. Собирали пять реакционных смесей. Твердое вещество собирали путем фильтрования с получением всего 330 г соединения (I) (чистота 99,3%) в виде светло-желтого твердого вещества (кристаллическая форма I). (m/z):  $[M+H]^+$  рассчит. для  $C_{20}H_{30}FN_7O_3S$  468,21 обнаруж. 468,3.

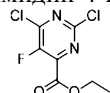
$^1H$ -ЯМР: 400 МГц DMSO- $d_6$   $\delta$  12,02 (с, 1H), 9,29 (с, 1H), 6,34 (с, 1H), 5,61 (ушир. с, 1H), 5,02 (т,  $J=6,8$  Гц, 1H), 4,33 (д,  $J=4,0$  Гц, 2H), 4,02 (с, 2H), 3,12 (кв,  $J=7,2$  Гц, 2H), 2,84 (с, 3H), 2,19 (с, 3H), 1,82-2,01 (м, 3H), 1,63-1,74 (м, 5H), 1,21 (т,  $J=7,2$  Гц, 3H).

Получение 3: этил-5-фтор-2,6-дигидроксиимидин-4-карбоксилат



Раствор 5-фтор-2,6-дигидроксиимидин-4-карбоновой кислоты (20,4 г, 120 ммоль) в DMF (200 мл) обрабатывали DBU (18,7 г, 123 ммоль) и перемешивали в течение 0,5 ч при 25°C. Затем, добавляли EtI (19,2 г, 123 ммоль), и нагревали полученный раствор до 60°C в течение 3 ч. К смеси добавляли  $H_2O$  (1000 мл), полученный осадок собирали путем фильтрования, промывали  $H_2O$  (200 мл) и сушили с получением этил-5-фтор-2,6-дигидроксиимидин-4-карбоксилата (19 г, выход 80%).

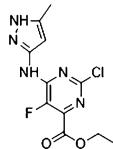
Получение 4: этил-2,6-дихлор-5-фторимидин-4-карбоксилат



Смесь этил-5-фтор-2,6-дигидроксиимидин-4-карбоксилата (5 г, 24,8 ммоль),  $PhNEt_2$  (2,58 г, 17,3

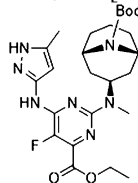
ммоль),  $\text{POCl}_3$  (130 г, 855,9 ммоль) нагревали до  $100^\circ\text{C}$  в течение 4 ч. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и вливали в воду со льдом (500 мл). Водный слой экстрагировали  $\text{EtOAc}$  (1000 мл), органический слой промывали нас.  $\text{NaHCO}_3$  (200 мл), соевым раствором (200 мл), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали в условиях вакуума. Остаток очищали методом колоночной хроматографии (80 г колонка; 0-50%  $\text{EtOAc}$  в гексанах) с получением этил-2,6-дихлор-5-фторпиримидин-4-карбоксилата в виде желтого масла (3,8 г, 65%).

Получение 5: этил-2-хлор-5-фтор-6-((5-метил-1Н-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-4-карбоксилат



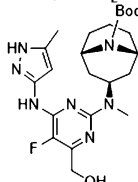
Смесь этил-2,6-дихлор-5-фторпиримидин-4-карбоксилата (3,8 г, 16 ммоль), 5-метил-1Н-пиразол-3-амин (1,86 г, 19 ммоль) и DIPEA (4 г, 32 ммоль) в  $\text{EtOH}$  (100 мл) перемешивали при к.т. в течение 2 ч. Реакционную смесь концентрировали в условиях вакуума. Затем, добавляли воду (500 мл), реакционную смесь фильтровали, осадок на фильтре промывали 100 мл  $\text{H}_2\text{O}$  и сушили в условиях вакуума с получением этил-2-хлор-5-фтор-6-((5-метил-1Н-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-4-карбоксилата (3,8 г, выход 80%).

Получение 6: трет-бутил-(1R,3s,5S)-3-((4-(этоксикарбонил)-5-фтор-6-((5-метил-1Н-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-2-ил)(метил)амино)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-9-карбоксилат



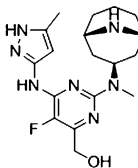
Смесь этил-2-хлор-5-фтор-6-((5-метил-1Н-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-4-карбоксилата (1,7 г, 5,684 ммоль), трет-бутил-(1R,3s,5S)-3-(метиламино)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-9-карбоксилата (2,17 г, 8,527 ммоль) и DIPEA (1,47 г, 11,368 ммоль) в  $\text{DMSO}$  (50 мл) нагревали до  $110^\circ\text{C}$  в течение 18 ч. Реакционную смесь вливали в воду (200 мл), реакционную смесь фильтровали, осадок на фильтре промывали 200 мл  $\text{H}_2\text{O}$  и сушили в условиях вакуума с получением неочищенного трет-бутил-(1R,3s,5S)-3-((4-(этоксикарбонил)-5-фтор-6-((5-метил-1Н-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-2-ил)(метил)амино)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-9-карбоксилата (3,5 г, неочищ.). ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  рассчит. для  $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{FN}_7\text{O}_4$  518,29 обнаруж. 518,2.

Получение 7: трет-бутил-(1R,3s,5S)-3-((5-фтор-4-(гидроксиметил)-6-((5-метил-1Н-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-2-ил)(метил)амино)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-9-карбоксилат



Смесь трет-бутил-(1R,3s,5S)-3-((4-(этоксикарбонил)-5-фтор-6-((5-метил-1Н-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-2-ил)(метил)амино)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-9-карбоксилат (3,5 г, 7 ммоль),  $\text{NaBH}_4$  (2,1 г, 56 ммоль) и  $\text{CaCl}_2$  (3,1 г, 28 ммоль) в смеси  $\text{EtOH}$  (50 мл) и  $\text{THF}$  (50 мл) перемешивали в течение ночи при  $25^\circ\text{C}$ . Реакционную смесь гасили добавлением  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (водн.) (80 мл) и  $\text{H}_2\text{O}$  (80 мл), водный слой экстрагировали  $\text{EtOAc}$  ( $3 \times 100$  мл), объединенные органические слои промывали соевым раствором, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрировали в условиях вакуума. Остаток очищали методом препаративной HPLC с получением трет-бутил-(1R,3s,5S)-3-((5-фтор-4-(гидроксиметил)-6-((5-метил-1Н-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-2-ил)(метил)амино)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-9-карбоксилата (1,4 г, 44%). ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  рассчит. для  $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{FN}_7\text{O}_3$  476,28 обнаруж. 476,3.

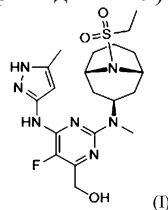
Получение 8: (2-(((1R,3s,5S)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)(метил)амино)-5-фтор-6-((5-метил-1Н-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-4-ил)метанол



Раствор трет-бутил-(1R,3s,5S)-3-((5-фтор-4-(гидроксиметил)-6-((5-метил-1Н-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-2-ил)(метил)амино)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-9-карбоксилата (1,4 г, 2,95 ммоль) в смеси  $\text{HCl}$ /диоксан (50 мл) перемешивали при  $25^\circ\text{C}$  в течение 4 ч. Реакционную смесь фильтровали, осадок на

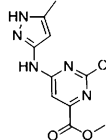
фильтре промывали 100 мл EtOAc и сушили в условиях вакуума с получением (2-(((1R,3s,5S)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)(метил)амино)-5-фтор-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-4-ил)метанола (1,4 г, 100%). (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчит. для C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>FN<sub>7</sub>O 376,23 обнаруж. 376,2.

Получение 9: (2-(((1R,3s,5S)-9-(этилсульфонил)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)(метил)амино)-5-фтор-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-4-ил)метанол



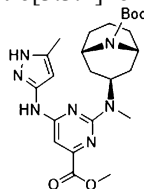
(2-(((1R,3s,5S)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)(метил)амино)-5-фтор-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-4-ил)метанол (95 мг, 0,253 ммоль) растворяли в пиридине (4,0 мл) и обрабатывали этансульфонилхлоридом (0,024 мл, 0,253 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч, а затем концентрировали в условиях вакуума. Неочищенный остаток растворяли в 3 мл смеси уксусная кислота/вода=1/1, фильтровали для удаления твердых частиц и очищали методом препаративной HPLC (Agilent Dynamax 250×21,4 мм, 10 мкм, 15 мл/мин, 2-50% ACN+0,05% TFA/ACN) с использованием градиента 2-50% ACN в воде с 0,05% TFA). Чистые фракции собирали и лиофилизировали с получением трифторацетата указанного в заголовке соединения (12,92 мг, выход 8,8%, чистота 99,9%). (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчит. для C<sub>20</sub>H<sub>31</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S 468,22 обнаруж. 468.

Получение 10: метил-2-хлор-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-4-карбоксилат



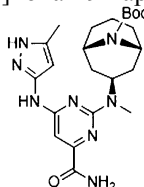
Смесь 5-метил-1H-пиразол-3-амин (5,6 г, 58 ммоль), метил-2,6-дихлорпиримидин-4-карбоксилата (12,0 г, 58 ммоль) и DIPEA (15,0 г, 116 ммоль) в DMSO (120 мл) перемешивали при 25°C в течение 12 ч. Добавляли H<sub>2</sub>O (500 мл), выпавшее в осадок твердое вещество собирали путем фильтрования с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (15 г, 97%) в виде желтого твердого вещества. (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчит. для C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub> 268,05 обнаруж. 268,1.

Получение 11: трет-бутил-(1R,3s,5S)-3-((4-(метоксикарбонил)-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-2-ил)(метил)амино)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-9-карбоксилат



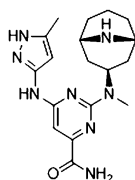
Смесь метил-2-хлор-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-4-карбоксилата (12,0 г, 45 ммоль), трет-бутил-(1R,3s,5S)-3-(метиламино)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-9-карбоксилата (13,7 г, 54 ммоль) и DIPEA (12,0 г, 90 ммоль) в NMP (120 мл) перемешивали при 120°C в течение 16 ч. Реакционную смесь вливали в H<sub>2</sub>O (2000 мл), выпавшее в осадок твердое вещество собирали путем фильтрования с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (15 г, 68%) в виде белого твердого вещества. (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчит. для C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub> 486,28 обнаруж. 486,3.

Получение 12: трет-бутил-(1R,3s,5S)-3-((4-карбамоил-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-2-ил)(метил)амино)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-9-карбоксилат



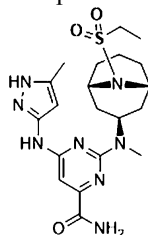
В герметизированной пробирке емкостью 100 мл к трет-бутил-(1R,3s,5S)-3-((4-(метоксикарбонил)-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-2-ил)(метил)амино)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-9-карбоксилату (3 порции по 2 г, 4,12 ммоль) добавляли NH<sub>3</sub>/MeOH (3 аликвоты по 60 мл), и перемешивали реакционную смесь при 25°C в течение 12 ч. Реакционную смесь концентрировали в условиях вакуума с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (3,7 г, 64%). (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчит. для C<sub>23</sub>H<sub>35</sub>N<sub>8</sub>O<sub>3</sub> 471,28 обнаруж. 471,3.

Получение 13: 2-(((1R,3s,5S)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)(метил)амино)-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-4-карбоксамид



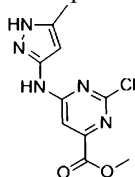
К смеси трет-бутил-(1R,3s,5S)-3-((4-карбамоил-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-2-ил)(метил)амино)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-9-карбоксилата (3,7 г, 7,9 ммоль) в диоксане (185 мл) добавляли HCl/диоксан (37 мл). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 3 ч. Методом TLC обнаруживали отсутствие исходного вещества. Растворитель удаляли, и промывали неочищенный продукт смесью этилацетат/MeOH (100/1) с получением указанного в заголовке промежуточного соединения в виде гидрохлорида (4,0 г, 95%). (m/z):  $[M+H]^+$  рассчит. для  $C_{18}H_{27}N_8O$  371,23 обнаруж. 371,1.

Получение 14: 2-(((1R,3s,5S)-9-(этилсульфонил)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)(метил)амино)-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-4-карбоксамид (C-1)



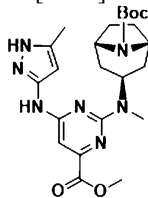
2-(((1R,3s,5S)-9-азабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)(метил)амино)-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-4-карбоксамид (40 мг, 0,108 ммоль) и DIPEA (0,057 мл, 0,324 ммоль) растворяли в DMF (1,50 мл) и охлаждали до 0°C. Добавляли этансульфонилхлорид, реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение 72 ч. Реакционную смесь концентрировали в условиях вакуума, и очищали неочищенный продукт методом обращенно-фазовой препаративной HPLC (Agilent Dynamax 250x21,4 мм, 10 мкм, 15 мл/мин, 2-70% ACN+0,1% TFA/ACN) с получением трифторацетата указанного в заголовке соединения (4,5 мг, 9,01%). (m/z):  $[M+H]^+$  рассчит. для  $C_{20}H_{31}N_8O_3S$  463,22 обнаруж. 463,2.

Получение 15: метил-2-хлор-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-4-карбоксилат



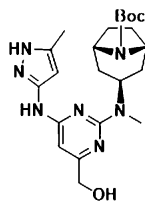
Смесь 5-метил-1H-пиразол-3-амина (5,6 г, 58 ммоль), метил-2,6-дихлорпиримидин-4-карбоксилата (12,0 г, 58 ммоль) и DIPEA (15,0 г, 116 ммоль) в DMSO (120 мл) перемешивали при 25°C в течение 12 ч. Добавляли  $H_2O$  (500 мл), и собирали выпавшее в осадок твердое вещество путем фильтрования с получением указанного в заголовке соединения (15 г, 97%). (m/z):  $[M+H]^+$  рассчит. для  $C_{10}H_{11}ClN_5O_2$  268,05 обнаруж. 268,1.

Получение 16: трет-бутил-(1R,3s,5S)-3-((4-(метоксикарбонил)-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-2-ил)(метил)амино)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-карбоксилат



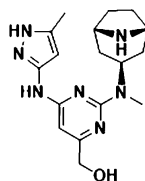
Смесь метил-2-хлор-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-4-карбоксилата (8,3 г, 31,0 ммоль), трет-бутил-(1R,3s,5S)-3-(метиламино)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-карбоксилата (8,2 г, 34,1 ммоль) и DIPEA (10,8 мл, 62,0 ммоль) в DMSO (85 мл) перемешивали при 120°C в течение 16 ч. Смесь вливали в 2 л воды, энергично перемешивали, а затем фильтровали с получением указанного в заголовке соединения (11,1 г, 76%). (m/z):  $[M+H]^+$  рассчит. для  $C_{23}H_{34}N_7O_4$  472,27 обнаруж. 472,3.

Получение 17: трет-бутил-(1R,3s,5S)-3-((4-(гидроксиметил)-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиримидин-2-ил)(метил)амино)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-карбоксилат



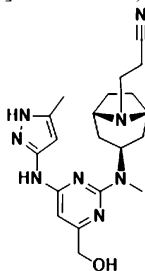
К смеси  $\text{NaBH}_4$  (8 г, 212 ммоль) в MeOH (100 мл) при 0°C добавляли трет-бутил-(1R,3s,5S)-3-((4-(метоксикарбонил)-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиридин-2-ил)(метил)амино)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-карбоксилат (10 г, 21,2 ммоль) в THF (100 мл). Затем реакционную смесь нагревали до температуры возгонки в течение 1 ч. Реакционную смесь гасили добавлением воды (500 мл) и экстрагировали смесь этилацетатом (3×200 мл). Объединенные органические слои промывали соевым раствором (1×100 мл), сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрировали в условиях вакуума. Неочищенный остаток очищали методом флэш-хроматографии на силикагеле (петролейный эфир/этилацетат=4/1) с получением указанного в заголовке соединения (7 г, 68%). (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  рассчит. для  $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_7\text{O}_3$  444,27 обнаруж. 444,3.

Получение 18: (2-(((1R,3s,5S)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)(метил)амино)-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиридин-4-ил)метанол



Смесь трет-бутил-(1R,3s,5S)-3-((4-(гидроксиметил)-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиридин-2-ил)(метил)амино)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-карбоксилата (6,5 г, 14,7 ммоль) в смеси HCl/диоксан (100 мл) перемешивали при к.т. в течение 1 ч. Смесь концентрировали в условиях вакуума с получением гидрохлорида указанного в заголовке промежуточного соединения (4,8 г, 100%). (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  рассчит. для  $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{O}$  344,22 обнаруж. 344,1.

Получение 19: 3-((1R,3s,5S)-3-((4-(гидроксиметил)-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)-амино)пиридин-2-ил)(метил)амино)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-ил)пропаннитрил (C-2)



(2-(((1R,3s,5S)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)(метил)амино)-6-((5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)пиридин-4-ил)метанол (50 мг, 0,146 ммоль) и DIPEA (0,076 мл, 0,437 ммоль) растворяли в MeOH (1,50 мл). Добавляли акрилонитрил (0,014 мл, 0,218 ммоль) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 90 мин. Затем реакционную смесь концентрировали в условиях вакуума, и очищали неочищенный остаток методом обращенно-фазовой препаративной HPLC (Agilent Dyna-таx 250×21,4 мм, 10 мкм, 15 мл/мин, 2-60% ACN+0,1% TFA/ACN) с получением трифторацетата указанного в заголовке соединения (14 мг, 19%). (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  рассчит. для  $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_8\text{O}$  397,25 обнаруж. 397,1.

Пример 1. Порошковая рентгеновская дифрактометрия кристаллической формы I

Рентгеновские порошковые дифрактограммы, представленные на фиг. 1, получали при помощи рентгеновского дифрактометра Bruker D8-Advance с использованием Cu-K $\alpha$  излучения ( $\lambda=1,54051 \text{ \AA}$ ) с выходным напряжением 45 кВ и током 40 мА. Прибор работал в геометрии Брэгга-Брентано с падающим, расходящимся пучком и рассеивающими щелями, установленными для максимального увеличения интенсивности на образце. Для измерения небольшое количество порошка (5-25 мг) осторожно уплотняли на держателе образца для формирования гладкой поверхности и подвергали воздействию рентгеновского излучения. Образцы сканировали в режиме 2 $\theta$ -2 $\theta$  со значениями 2 $\theta$  от 2 до 35° с размером шага 0,02° и скоростью сканирования 0,30° с на шаг. Сбор данных контролировали с использованием измерительного программного обеспечения Bruker DiffraSuite и анализировали при помощи программного обеспечения Jade (версия 7.5.1). Прибор калибровали с использованием корундового стандарта в пределах  $\pm 0,02^\circ$  от угла 2 $\theta$ . Наблюдаемые положения PXRD-пиков 2 $\theta$  и d-расстояний для кристаллической формы I представлены в табл. 1.

Таблица 1. Данные PXRD для кристаллической формы I

| 2 $\theta$ | d(Å)  | Площадь | A%   |
|------------|-------|---------|------|
| 5,91       | 14,94 | 10324   | 6,1  |
| 6,28       | 14,06 | 25530   | 15   |
| 6,75       | 13,08 | 27629   | 16,2 |
| 8,08       | 10,94 | 3161    | 1,9  |
| 11,19      | 7,90  | 70185   | 41,3 |
| 11,73      | 7,54  | 170124  | 100  |
| 12,48      | 7,09  | 9018    | 5,3  |
| 13,52      | 6,55  | 12923   | 7,6  |
| 14,25      | 6,21  | 31558   | 18,5 |
| 14,64      | 6,05  | 30799   | 18,1 |
| 15,02      | 5,89  | 5121    | 3    |
| 15,68      | 5,65  | 4744    | 2,8  |
| 16,68      | 5,31  | 9857    | 5,8  |
| 17,62      | 5,03  | 32112   | 18,9 |
| 18,10      | 4,90  | 15613   | 9,2  |
| 18,80      | 4,72  | 109849  | 64,6 |
| 19,29      | 4,60  | 135137  | 79,4 |
| 20,53      | 4,32  | 49854   | 29,3 |
| 21,53      | 4,12  | 2321    | 1,4  |
| 22,16      | 4,01  | 9590    | 5,6  |
| 24,24      | 3,67  | 1915    | 1,1  |
| 25,52      | 3,49  | 8578    | 5    |
| 28,93      | 3,08  | 3263    | 1,9  |
| 29,89      | 2,99  | 10836   | 6,4  |
| 30,44      | 2,93  | 3804    | 2,2  |

## Пример 2. Анализ формы I

Дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) проводили с использованием модуля TA Instruments Model Q-100 с контроллером Thermal Analyst. Данные собирали и анализировали с использованием программного обеспечения TA Instruments Thermal Analysis. Образец каждой кристаллической формы тщательно взвешивали в закрытой алюминиевой чаше. После 5-минутного периода изотермического уравнивания при 5°C, образец нагревали с использованием линейного градиента нагрева 10°C/мин от 0 до 300°C. Характерная DSC-термограмма кристаллической формы I представлена на фиг. 2. На термограмме представлена эндотерма плавления с началом приблизительно при 248,5°C и максимумом приблизительно при 250,9°C. При ~40°C и ~190°C на эндотерме наблюдались признаки незначительного предплавления.

Термогравиметрический анализ (TGA) проводили с использованием модуля TA Instruments Model Q-50 с высокой разрешающей способностью. Данные собирали с использованием контроллера TA Instruments Thermal Analyst и анализировали с использованием программного обеспечения TA Instruments Universal Analysis. Взвешенный образец помещали на платиновую чашу и сканировали со скоростью нагрева 10°C от температуры окружающей среды до 300°C. В процессе использования весовую и печную камеры продували потоком азота. Характерная кривая TGA кристаллической формы I согласно настоящему изобретению представлена на фиг. 3. Профиль TGA обнаруживает потерю массы приблизительно на 0,70% при 22-125°C при продувке N<sub>2</sub> и разложение с начальной температурой приблизительно 250°C.

Измерения динамической сорбции влаги (DMS) проводили с использованием работающих при атмосферном давлении микровесов VTI, SGA-100 system (VTI Corp., Hialeah, FL 33016). Использовали взвешенный образец, и наименьшее из возможных значение влажности (близкое к 0% RH) наблюдалось в начале анализа. Анализ DMS состоял из начальной стадии сушки (0% RH) в течение 120 мин с последующими двумя циклами сорбции и десорбции со скоростью сканирования 5% RH/шаг в диапазоне значений влажности от 5% RH до 90% RH. Измерения DMS проводили изотермически при 25°C. Характерная кривая DMS для формы I представлена на фиг. 4. Общее поглощение влаги в диапазоне от 5 до 90% RH составило 1,96%. Анализ формы I по Карлу Фишеру показал, что она содержит 1,6% мас./мас. воды.

## Получение 20: Получение формы II

В смеси 70 мл EtOH и 154 мл THF суспендировали 28 г соединения 2-6, а затем охлаждали до 5°C. К этой суспензии в течение 1 ч добавляли 82 мл LiBH<sub>4</sub> (2,0 М в THF). После добавления температуру повышали до 10°C и перемешивали в течение 2 ч, после чего не обнаруживали исходное вещество методом HPLC-анализа. Затем реакционную смесь гасили добавлением смеси 16,8 г хлорида аммония, растворенного в 77 мл воды. После нагревания до 45°C в течение 3 ч добавляли 467 мл воды. После добавления 370 мл из этого объема воды наблюдали формирование кристаллического вещества. После завершения добавления воды взвесь выдерживали при 45°C в течение 5 ч, а затем линейно снижали до 15°C в течение 3 ч. После выдерживания взвеси при 15°C в течение 7,5 ч продукт фильтровали и промывали 140 мл EtOH, а затем двумя смывами по 140 мл воды. Твердое вещество сушили в условиях вакуума при 45°C с продувкой азотом в течение ночи с получением 22,6 г формы II (выход 87%, чистота 98,6%).

21 г формы II соединения (I) промежуточной степени очистки, полученной на предыдущей стадии, в 63 мл DMSO нагревали до 90°C. В течение 40 мин добавляли 420 мл n-PrOH, поддерживая температуру реакционной смеси выше 86°C. В ходе добавления последней трети nPrOH наблюдали очень мелкие лучепреломляющие кристаллы. Смесь перемешивали в течение 4 ч при 92°C. Смесь охлаждали до 20°C в течение 8 ч и перемешивали при 20°C в течение ночи. Продукт фильтровали и промывали 52,5 мл nPrOH, а затем дважды 52,5 мл этанола. Твердое вещество сушили в условиях вакуума с продувкой азотом при 55°C с получением 19,24 г формы II (выход 92%, чистота 99,6%).

Пример 3. Порошковая рентгеновская дифрактометрия кристаллической формы II Рентгеновские порошковые дифрактограммы, представленные на фиг. 5, получали в тех же условиях, что и описанные для формы I. Наблюдаемые положения PXRD-пигов 2 $\theta$  и d-расстояний для кристаллической формы I представлены в следующей таблице.

Таблица. Данные PXRD для кристаллической формы II

| 2 $\theta$ | d(Å) | Площадь | A%   |
|------------|------|---------|------|
| 8,9        | 10,0 | 35511   | 9,8  |
| 9,5        | 9,3  | 63058   | 17,4 |
| 10,2       | 8,7  | 91113   | 25,2 |
| 11,4       | 7,7  | 361711  | 100  |
| 14,4       | 6,1  | 29371   | 8,1  |
| 16,2       | 5,5  | 160020  | 44,2 |
| 16,6       | 5,3  | 173568  | 48   |
| 17,7       | 5,0  | 153041  | 42,3 |
| 19,0       | 4,7  | 112788  | 31,2 |
| 19,2       | 4,6  | 93782   | 25,9 |
| 19,8       | 4,5  | 54560   | 15,1 |
| 20,1       | 4,4  | 93452   | 25,8 |
| 20,4       | 4,3  | 111287  | 30,8 |
| 20,6       | 4,3  | 49977   | 13,8 |
| 20,8       | 4,3  | 58656   | 16,2 |
| 21,3       | 4,2  | 27118   | 7,5  |
| 21,9       | 4,1  | 289766  | 80,1 |
| 25,9       | 3,4  | 35768   | 9,9  |
| 30,1       | 3,0  | 26278   | 7,3  |
| 30,5       | 2,9  | 23740   | 6,6  |
| 30,9       | 2,9  | 51901   | 14,3 |
| 32,6       | 2,7  | 22443   | 6,2  |
| 33,8       | 2,7  | 23525   | 6,5  |

## Пример 4. Анализ формы II

Форму II тестировали в условиях, сходных с описанными для формы I.

Характерная DSC-термограмма кристаллической формы II представлена на фиг. 6. Термограмма характеризуется пиком эндотермического теплового потока, отождествляемого с переходом в расплав, с максимумом эндотермического теплового потока при температуре 238,1°C $\pm$ 2°C.

Характерная кривая TGA кристаллической формы II согласно настоящему изобретению представлена на фиг. 7. Профиль TGA обнаруживает ассоциированную с разложением потерю массы при температуре свыше 222°C.

Анализ DMS состоял из начальной стадии сушки (0% RH) в течение 120 мин с последующими двумя циклами сорбции и десорбции со скоростью сканирования 5% RH/шаг в диапазоне значений влажности от 5% RH до 90% RH. Измерения DMS проводили изотермически при 25°C. Характерная кривая DMS для формы II представлена на фиг. 8. Общее поглощение влаги в диапазоне от 5 до 90% RH составило приблизительно 0,02%.

Пример 5. Рентгеновская дифрактометрия монокристалла формы II

Данные собирали на дифрактометре Rigaku Oxford Diffraction Supernova Dual Source, Cu at Zero, Atlas CCD, оснащенный охлаждающим устройством Oxford Cryosystems Cobra. Данные собирали с использованием Cu K $\alpha$  излучения. Структуру расшивывали и дорабатывали с использованием пакета кристаллографического программного обеспечения Bruker AXS SHELXTL. Все подробности могут найдены в CIF. Если не указано иное, то атомы водорода, присоединенные к атому углерода, располагали геометрически и оставляли для доработки с запуском изотропных параметров перемещения. Атомы водорода, присоединенные к гетероатому, располагали в разностной карте Фурье оставляли для свободной доработки с использованием изотропных параметров перемещения.

Данные рентгеновского дифрактометрического анализа монокристалла формы II

|                                                                  |                                                                  |
|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Эмпирическая формула                                             | C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> FN <sub>7</sub> O <sub>3</sub> S |
| Молекулярная масса по формуле                                    | 467,57                                                           |
| Размер кристалла                                                 | 0,10×0,10×0,02 мм <sup>3</sup>                                   |
| Температура сбора данных                                         | 293(2) K                                                         |
| Длина волны для сбора данных                                     | 1,54178 Å                                                        |
| Кристаллическая система                                          | моноклинная                                                      |
| Группа симметрии                                                 | P2 <sub>1</sub> /n                                               |
| Постоянная решетки                                               | a=12,4330(8) Å                                                   |
|                                                                  | b=12,2675(9) Å                                                   |
|                                                                  | c=14,5337(8) Å                                                   |
|                                                                  | $\alpha=90^\circ$                                                |
|                                                                  | $\beta=96,996(6)^\circ$                                          |
|                                                                  | $\gamma=90^\circ$                                                |
| Объем элементарной ячейки                                        | 2200,2(2) Å <sup>3</sup>                                         |
| Z (число молекул в элементарной ячейке)                          | 4                                                                |
| Плотность (расчетная)                                            | 1,412 г/см <sup>3</sup>                                          |
| Диапазон тета для сбора данных                                   | от 4,422 до 75,445°                                              |
| Диапазон индексов                                                | -15 ≤ h ≤ 15;<br>-12 ≤ k ≤ 15;<br>-18 ≤ l ≤ 18                   |
| Зарегистрированных отражений                                     | 21349                                                            |
| Независимых отражений                                            | 4442 [R(int)=0,0762]                                             |
| Конечные показатели R [F <sub>2</sub> > 2sigma(F <sub>2</sub> )] | R1=0,0568, wR2=0,1294                                            |
| Показатели R (все данные)                                        | R1=0,1028, wR2=0,1599                                            |

#### Биологические методы анализа

Метод анализа 1: Биохимический анализ JAK и Tyk2 киназ

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

Серийно или раздельно разбавленные соединения предварительно инкубировали с каждым из четырех ферментов JAK и субстратом в белых 384-луночных микропланшетах (Corning) при температуре окружающей среды в течение 1 ч. Затем, добавляли АТФ для инициирования киназных реакций в общем объеме 10 мл с 1% DMSO. Конечные концентрации фермента для JAK1, 2, 3 и Tyk2 составляли 4,2, 0,1, 1 и 0,25 нМ соответственно; соответствующие используемые концентрации K<sub>m</sub> АТФ составляли 25, 3, 1,6 и 10 мкМ; тогда как концентрация субстрата составляла 200 нМ для всех четырех анализов. Киназные реакции оставляли протекать в течение 1 ч при температуре окружающей среды, после чего добавляли 10 мкл полученного раствора EDTA (конечная концентрация 10 mM) и Tb-анти-pSTAT1 (pTyr701) анти-тело (Life Technologies, конечная концентрация 2 нМ) в буфере для разбавления для проведения TR-FRET (Life Technologies). Планшеты оставляли инкубироваться при температуре окружающей среды в течение 1 ч, после чего считывали на считывающем устройстве Envision (Perkin Elmer). Отношение сигналов испускания (520 нм/495 нм) регистрировали и использовали для расчета выраженного в процентах ингибирования относительно контроля с DMSO и фонового контроля.

Для анализа дозозависимого ответа на графике откладывали данные ингибирования в процентах относительно концентраций соединения, и определяли значения  $IC_{50}$  из четырехпараметрической робастной модели аппроксимации с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad Software). Результаты выражали в виде  $pIC_{50}$  (отрицательный логарифм  $IC_{50}$ ), а затем преобразовывали до  $pKi$  (отрицательный логарифм константы диссоциации  $Ki$ ) с использованием уравнения Ченга-Пруссоффа.

Таблица 2. Значения  $pKi$  для соединения (I)

|                | JAK 1<br>( $pKi$ ) | JAK 2<br>( $pKi$ ) | JAK 3<br>( $pKi$ ) | Tyk2<br>( $pKi$ ) |
|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| Соединение (I) | 10,2               | 10,2               | 9,1                | 9,9               |

Метод анализа 2:

Клеточный анализ активности в отношении JAK: Ингибирование IL-13-индуцированного фосфорилирования STAT6 в клетках BEAS-2B

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

Клетки выращивали при 37°C в кондиционированном 5% CO<sub>2</sub> инкубаторе в среде 50% DMEM/50% F-12 (Life Technologies), дополненной 10% FBS (Hyclone), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Life Technologies) и 2 мМ GlutaMAX (Life Technologies). На 1-е сутки анализа, клетки высевали с плотностью 7500 клеток на лунку в покрытые поли-D-лизином белые 384-луночные планшеты (Corning) с 25 мкл среды и оставляли для прикрепления в течение ночи в инкубаторе. В 2-е сутки анализа среду удаляли и заменяли 12 мл аналитического буфера (сбалансированный солевой раствор Хэнка/HBSS, 25 мМ HEPES и 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина/BSA), содержащего исследуемую в отношении ответа дозу тестируемых соединений. Соединения серийно разбавляли DMSO, а затем дополнительно 1000-кратно разбавляли средой до получения конечной концентрации DMSO, равной 0,1%. Клетки инкубировали с тестируемыми соединениями при 37°C в течение 1 ч, с последующим добавлением 12 мкл предварительно нагретого IL-13 (80 нг/мл в аналитическом буфере) для стимуляции. После инкубации при 37°C в течение 30 мин удаляли аналитический буфер (содержащий соединение и IL-13) и добавляли 10 мкл буфера для лизиса клеток (25 мМ HEPES, 0,1% SDS, 1% NP-40, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1,3 мМ EDTA, 1 мМ EGTA и дополненный коктейлем ингибиторов протеаз Complete Ultra mini и PhosSTOP от Roche Diagnostics). Планшеты встряхивали при температуре окружающей среды в течение 30 мин, после чего добавляли реагенты для детекции. Сначала добавляли смесь биотин-анти-pSTAT6 и анти-STAT6-конъюгированных акцепторных гранул, и инкубировали при температуре окружающей среды в течение 2 ч, а затем добавляли конъюгированные со стрептавидином донорные гранулы (Perkin Elmer). После инкубации в течение 2 ч как минимум аналитические планшеты считывали на устройстве для считывания планшет Envision. Регистрировали сигналы люминесценции AlphaScreen и использовали их для расчета выраженного в процентах ингибирования относительно контроля с DMSO и фонового контроля.

Для анализа дозозависимого ответа на графике откладывали данные ингибирования в процентах относительно концентраций соединения и определяли значения  $IC_{50}$  из четырехпараметрической робастной модели аппроксимации с использованием программного обеспечения Prism. Результаты также могут быть выражены в виде отрицательного логарифма значения  $IC_{50}$ ,  $pIC_{50}$ . В данном методе анализа значение  $pIC_{50}$  для соединения (I) составило 8,5.

Метод анализа 3: Анализ цитотоксичности

Люминесцентный анализ жизнеспособности/цитотоксичности клеток CellTiter-Glo проводили на эпителиальных клетках легкого человека BEAS-2B (ATCC) в условиях нормального роста.

Клетки выращивали при 37°C в кондиционированном 5% CO<sub>2</sub> инкубаторе в среде 50% DMEM/50% F-12 (Life Technologies), дополненной 10% FBS (Hyclone), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Life Technologies) и 2 мМ GlutaMAX (Life Technologies). На сутки 1 анализа, клетки высевали с плотностью 500 клеток/лунка в белые 384-луночные культуральные планшеты (Corning) с 25 мкл среды и оставляли для прикрепления в течение ночи в инкубаторе. На сутки 2 анализа, добавляли 5 мкл среды, содержащей исследуемую в отношении ответа дозу тестируемых соединений, и инкубировали при 37°C в течение 48 ч. Затем добавляли 30 мл раствора для детекции CellTiter-Glo (Promega), смешивали на орбитальном шейкере в течение 5 мин и инкубировали еще в течение 10 мин, после чего считывали на считывающем устройстве Envision. Регистрировали сигналы люминесценции, и рассчитывали выраженные в процентах относительно контроля с DMSO значения.

Для анализа дозозависимого ответа на графике откладывали выраженные в процентах относительно контроля с DMSO значения относительно концентраций соединения с получением на графике дозозависимых кривых после соединения линиями экспериментальных точек. Концентрацию, при которой каж-

дая кривая пересекает порог ингибирования в 15%, определяли как  $CC_{15}$ . Результаты выражали в виде отрицательного логарифма значения  $CC_{15}$ ,  $pCC_{15}$ .

Предполагается, что тестируемые соединения, обладающие более низким значением  $pCC_{15}$  в данном методе анализа, будут характеризоваться меньшей вероятностью индукции цитотоксичности. Значение  $pCC_{15}$  для соединения (I) составило 5,36.

Метод анализа 4: Анализ TSLP-индуцированного высвобождения TARC in vitro в PBMC человека

Связывание TSLP с его рецептором вызывает конформационное изменение, которое активируют JAK1 и JAK2 для фосфорилирования различных факторов транскрипции, включая STAT3 и STAT5. В иммунных клетках, постоянно находящихся в коже, это индуцирует каскад внутриклеточных событий, которые приводят к пролиферации клеток, антиаптозу, миграции дендритных клеток и продукции Th2 цитокинов и хемокинов. Во время острой фазы atopического дерматита в кожу проникают лимфоциты Th2. В первичных мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) TSLP оказывает провоспалительное действие путем активации миелоидных дендритных клеток для привлечения и стимуляции Т-клеток. Этот процесс опосредован хемокином, регулируемым тимусом и активацией (TARC/CCL17). TARC оказался перспективным клиническим биомаркером atopического дерматита, причем высокое содержание в сыворотке крови указывало на ускоренный патогенез кожного воспаления.

В этом методе анализа было показано, что стимуляция TSLP индуцирует высвобождение TARC из PBMC, и что этот ответ ослабляется в зависимости от дозы при лечении соединением (I). PBMC (ранее выделенные из цельной крови и замороженные в аликвотах при  $-80^{\circ}\text{C}$ ) от 3 доноров размораживали, высеивали и оставляли при  $37^{\circ}\text{C}$  на 1 ч. Клетки предварительно обрабатывали в течение 1 ч серией 3,7-кратных разбавлений в диапазоне от 33,3 мкМ до 0,95 нМ соединения (I). Затем клетки либо стимулировали 10 нг/мл TSLP, либо добавляли эквивалентный объем среды без добавок в качестве фонового контроля. Спустя 48 ч от клеток собирали супернатанты и измеряли TARC с использованием набора для ELISA Quantikine для определения CCL17/TARC человека.

Для анализа дозозависимого ответа, на графике откладывали данные ингибирования в процентах относительно концентраций соединения, и определяли значения  $IC_{50}$  из четырехпараметрической робастной модели аппроксимации с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Результаты также могут быть выражены в виде отрицательного логарифма значения  $IC_{50}$ ,  $pIC_{50}$ . В данном методе анализа значение  $pIC_{50}$  для соединения (I) составило 7,8.

Метод анализа 5: Анализ фармакокинетики на крысах

Целью данного исследования было оценить фармакокинетику соединения (I) в плазме крови после однократного перорального (PO,  $n=3$ ) или внутривенного (IV,  $n=2$ ) введения самцам крыс Sprague Dawley.

Трем самцам крыс Sprague Dawley вводили однократную IV дозу соединения (I) (1,0 мг/кг в 5% ДМСО+20 мМ цитратного буфера, pH 4) через катетер в яремной вене или однократную PO дозу 5 мг/кг через желудочный зонд (5,0 мг/кг в 1% НРМС с 0,1% Tween 80). Спустя 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6 и 24 ч после введения дозы, образцы крови отбирали через катетер в яремной вене в пробирки с EDTA и поддерживали охлажденными на льду перед центрифугированием (12000 об/мин, 4 мин,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Аликвоты плазмы переносили в кассетные пробирки и хранили в замороженном виде ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) до проведения биоанализа.

Образцы плазмы перемешивали встряхиванием, после чего 50 мкл аликвоты образца переносили в 96-луночный планшет и экстрагировали 200 мкл ацетонитрила, содержащим внутренний стандарт. После экстрагирования образцы центрифугировали в течение 10 мин при 3700 об/мин (2809 $\times$ g). Супернатант переносили в новый 96-луночный планшет, а затем разбавляли 0,2% муравьиной кислотой в воде (3-кратное разбавление). Для всех образцов 10 мкл наносили на колонку Waters Xbridge (C18 30 $\times$ 2,1 мм) со скоростью потока 0,80 мл/мин. Подвижная фаза А состояла из 0,2% муравьиной кислоты в воде, и подвижная фаза В состояла из 0,2% муравьиной кислоты в ацетонитриле. Значения содержания соединения (I) в плазме крови определяли методом LCMS/MS анализа. Стандартные параметры фармакокинетики определяли с использованием Phoenix WinNonlin (Certara Inc.).

Таблица 3. Параметры фармакокинетики

|                           | IV (1 мг/кг) | PO (5 мг/кг) |
|---------------------------|--------------|--------------|
| $T_{1/2}$ (ч)             | 1,34         | ND           |
| $C_{\text{max}}$ (мкг/мл) | 0,907        | 0,077        |
| $AUC_{(0-4)}$ (мкг-ч/мл)  | 0,291        | 0,112        |
| CL (л/ч/кг)               | 3,54         | ND           |
| $V_{\text{dss}}$ (л/кг)   | 1,1          | ND           |
| F%                        | ND           | 7,7          |

ND, не определено.

Метод анализа 6: Фармакокинетика в коже мини-пигов Hanford

Цель этого исследования состояла в том, чтобы определить фармакокинетику соединения (I) в эпидермисе, коже и плазме крови после 24-часового воздействия на кожу интактных мини-пигов Hanford.

Соединение (I) в количестве 0,5% (мас./мас.) включали в состав крема или мази, описанных в табл. 4 как лекарственная форма А и лекарственная форма В, соответственно.

Таблица 4. Лекарственные формы соединения (I)

| Лекарственная форма А<br>(крем)    |       | Лекарственная форма В<br>(мазь)             |       |
|------------------------------------|-------|---------------------------------------------|-------|
| Соединение (I)                     | 0,5%  | Соединение (I)                              | 0,5%  |
| Стеариновая кислота                | 5%    | Октилгидроксистеарат                        | 5%    |
| Цетостеариловый спирт              | 5%    | C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub> триглицерид | 5%    |
| Изопропилпальмитат                 | 4%    | Вазелин (вазелиновое масло)                 | 79,5% |
| Октилгидроксистеарат               | 2%    | N-метилпирролидон                           | 10%   |
| BRIJ S2 (PEG 2 стеариловый эфир)   | 1,08% |                                             |       |
| BRIJ S20 (PEG 20 стеариловый эфир) | 6,92% |                                             |       |
| N-метилпирролидин                  | 10%   |                                             |       |
| PEG 400                            | 10%   |                                             |       |
| Вода (очищ. обр. осмос)            | 55,5% |                                             |       |

За 24 ч до введения дозы, со спины мини-пигов Hanford массой 10-15 кг сбривали волосы, обнажая площадь не менее 700 см<sup>2</sup> (около 10% поверхности тела). В нулевой момент времени на спину мини-пигов наносили соединение (I) в дозе 25 мкг/см<sup>2</sup>. Кожу покрывали адгезивным покрытием для предотвращения потери соединения в клетку или подстилку. После 24-часового воздействия спины осторожно промывали мылом и водой для удаления неабсорбированного лекарственного средства и подсушивали. Сразу после этого промывания, при помощи венопункции у мини-пигов отбирали кровь. Затем, путем резкого снятия липкой ленты удаляли наружный слой кожи (роговой слой). После воздействия на эпидермис проводили шипковую 0,5 см биопсию. Эпидермис и дерму быстро отделяли, взвешивали и быстро замораживали. Подобные образцы отбирали через 94 ч и через 168 ч (7 суток) после введения дозы мини-пигам. Образцы эпидермиса и дермы гомогенизировали в воде в соотношении 1:10 (мас./об.) с использованием ультразвукового гомогенизатора Covaris. Образцы экстрагировали 3 объемами ацетонитрила и количественно оценивали относительно стандартной кривой методом LC-MS анализа. Как свидетельствуют параметры фармакокинетики (табл. 5), в эпидермисе и дерме соединение оказывало значительное воздействие, тогда как воздействие в плазме крови было ниже предела количественного определения (0,001 мкг/мл), что указывает на очень ограниченное всасывание соединения в системный кровоток.

Таблица 5. Параметры фармакокинетики, полученные для обеих лекарственных форм соединения (I)

|                                              | Лекарственная форма А | Лекарственная форма В |
|----------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| C <sub>max</sub> (мкг/мл) для плазмы         | <0,001                | <0,001                |
| AUC <sub>0-4</sub> (мкг·ч/мл) для плазмы     | <0,001                | <0,001                |
| C <sub>max</sub> (мкг/мл) для эпидермиса     | 10,9                  | 35,8                  |
| AUC <sub>0-4</sub> (мкг·ч/мл) для эпидермиса | 395                   | 1320                  |
| C <sub>max</sub> (мкг/мл) для дермы          | 0,47                  | 1,52                  |
| AUC <sub>0-4</sub> (мкг·ч/мл) для дермы      | 17,8                  | 64,8                  |

Метод анализа 7: Фармакодинамический (PD) анализ JAK ex vivo с использованием свежесеченной кожи человека

Фармакодинамический (PD) анализ JAK ex vivo проводили с использованием выделенной кожной ткани человека. В PD анализе использовали свежесеченную кожу человека (дерматом толщиной 750 мкм), которую размещали в статичных ячейках Франца с площадью поверхности ~0,5 см<sup>2</sup>. Камеру-приемник ячеек Франца заполняли теплой (37°C) среды для кератинизации и в инкубатор при 37°C. На кожу местно наносили 10 мкл (~18 мкл/см<sup>2</sup>) соединения (I) или основы и оставляли нетронутой в течение ночи (~24 ч). На следующие сутки, без повторной аппликации соединения или основы, среду заменяли Th1-направленный стимуляционный коктейль, состоящий из TNFα, IFNγ и IL-12. Кожу оставляли нетронутой дополнительно в течение 16 ч, а затем брали для исследования и проводили экстрагирование RNA и qPCR биомаркеров: CXCL10, CCL2. В качестве внутреннего стандарта использовали GAPDH. Соединение (I) включали в состав лекарственной формы в виде мази в количестве 0,5%. Состав мазевой основы представлен в табл. 6. Использовали сумму от трех доноров (обработки образца тестировали в четырех повторях). Эффект лечения рассчитывали как выраженное в процентах увеличение или снижение

стимуляции по сравнению с группой с нанесением основы.

Таблица 6. Композиция мазевой основы

|                                             |       |
|---------------------------------------------|-------|
| Октилгидроксистеарат                        | 5%    |
| C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub> триглицерид | 5%    |
| Вазелин (вазелиновое масло)                 | 79,5% |
| N-метилпирролидон                           | 5%    |
| Бензиловый спирт                            | 5%    |

#### Результаты PD анализа ex vivo кожи человека

Данные суммированы в табл. 7. Экспрессия гена CXCL10, который кодирует интерферон-у-индуцируемый белок 10 (IP-10), ингибировалась соединением (I) на 90,1% по сравнению с контрольной группой с TH1/основой. Применительно к гену CCL2, который кодирует моноцитарный хемоаттрактантный белок 1 (MCP-1), соединение (I) ингибировало ответ на 61,3%. Кроме того, для обеих лекарственных форм высокие концентрации соединения обнаруживали в эпидермальном и дермальном слоях кожи.

Таблица 7. Фармакодинамический эффект и распределение в эпидермисе и дерме 0,5% лекарственной формы соединения (I) в виде мази после приблизительно 40 ч непрерывного воздействия на свежесеченную кожу человека

| Соединение (I) | PD - Ингибирование (%)<br>(среднее±SD) |           | PK - Концентрация в ткани (мкМ,<br>среднее±SD) |         |
|----------------|----------------------------------------|-----------|------------------------------------------------|---------|
|                | CXCL10                                 | CCL2      | Эпидермис                                      | Дерма   |
| 0,5% мазь      | 90,1±15,1                              | 61,3±39,6 | 116,5±91,9                                     | 6,1±5,3 |

Данные представлены в виде среднее±станд. отклон., n=12 (3 донора, 4 образца на донора).

Метод анализа 8: Анализ проницаемости кожи человека

Целью этого эксперимента была оценка чрескожного всасывания тестируемых соединений через кожу человека после местного нанесения. В модели использовали иссеченную кожу человека, расположенную в специально сконструированных диффузионных камерах (статических или проточных), которые позволяют поддерживать кожу при температуре и влажности, соответствующим реальным условиям применения. Композицию наносили на поверхность кожи, и измеряли проникновение лекарственного средства путем мониторинга скорости его появления в принимающем растворе, протекающем под образцами кожи. Эта система in vitro позволяет точно регулировать многие возможные переменные, связанные с местным нанесением, такие как объемы дозирования, влажность, температура, стабильность лекарственного средства и толщина кожи.

В этом эксперименте использовали проточную диффузионную ячейку (MedFlux-HTTM), использующую тщательно спроектированный проточный канал с небольшими объемами пустот для оптимальных условий закладки, и было показано, что она обеспечивает локализованный зазор под полученной на дерматоме кожей для создания более точных и подробных профилей потока посредством автоматизированного сбора и оптимизированной флюидики. Эта система была разработана для минимизации специальным образом области дозирования во время экспериментов in vitro, обеспечивая тем самым большее количество повторений дозирования в пределах ограниченной площади поверхности кожи человека ex vivo.

Диффузионные ячейки помещали на подогревающую ячейку опоры и нагревали с использованием циркуляционной водяной бани для поддержания температуры поверхности кожи на уровне приблизительно 32°C. Ячейки подключали к многоканальным перистальтическим насосам, и поддерживали скорость потока приблизительно 10 мкл/мин (600 мкл/ч) для непрерывного потока приемной жидкости непосредственно под кожей. После непрерывного отбора проб в течение 24 ч образцы анализировали на содержание тестируемого соединения методом LC-MS/MS анализа. Тестируемое соединение обнаруживали в приемной жидкости через 20-28 ч после нанесения тестируемой лекарственной формы в виде мази (n=5). Используемая мазь раскрыта в методе анализа 7. Приемная жидкость представляла собой PBS с 0,1% Brij.

Таблица 8. Поток соединения (I), проникающего через 1 см<sup>2</sup> кожи человека

|                            | N | Проницаемость согласно MedFlux (нг/см <sup>2</sup> /с) |                |
|----------------------------|---|--------------------------------------------------------|----------------|
|                            |   | Среднее                                                | Станд. отклон. |
| Соединение (I) (0,5% мазь) | 5 | 39,1                                                   | 10,9           |

Как представлено в табл. 8, соединение (I) обнаруживает адекватную проницаемость.

Метод анализа 9: Анализ IL-31-pSTAT3 JAK target engagement на мышах in vivo

Для оценки местного связывания с мишенью в коже мышей использовали модель IL-31-индуцированной продукции фосфорилированного переносчика сигнала и активатора транскрипции 3 (pSTAT3) на мышах in vivo.

Путь передачи сигналов JAK/STAT (Janus-киназа/переносчик сигнала и активатор транскрипции)

является ключевым элементом коммуникации между клетками иммунной системы и активируется, главным образом, через цитокиновые рецепторы. Связывание цитокина IL-31 приводит к активации и фосфорилированию тирозинкиназ JAK1/JAK2, которые, в свою очередь, приводят к фосфорилированию STAT3 (pSTAT3). Затем активированный STAT перемещается в ядро и напрямую регулирует транскрипцию цитокин-чувствительных генов. В данных исследованиях, мышам Balb/c вводили композицию соединения (I) в виде мази. Мазевую основу (табл. 9) или соединение (I), приготовленное в мазевой основе, наносили местно на бритую кожу (25 мкл/см<sup>2</sup>) за 30 мин до внутрикожной инъекции (50 мкл на участок 1×1 см<sup>2</sup>) IL-31 (1 мкг/мл) на бритый участок кожи 1×1 см<sup>2</sup> на спине между ушами. Через час после введения IL-31 отбирали биоптаты кожи. Образцы ткани были быстро замораживали и анализировали методом ELISA на содержание pSTAT3 и концентрацию соединения. Соединение (I) ингибировало продукцию pSTAT3 на 80%, а концентрация соединения (I) в кожной ткани составляла 62 мкМ.

Таблица 9. Композиция мазевой основы

|                                             |       |
|---------------------------------------------|-------|
| Октилгидроксистеарат                        | 5%    |
| C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub> триглицерид | 5%    |
| Вазелин (вазелиновое масло)                 | 79,5% |
| N-метилпирролидон                           | 5%    |
| Бензиловый спирт                            | 5%    |

Метод анализа 10: Модель ТРА-индуцированного острого дерматита на мышах *in vivo*

Целью данного метода анализа является оценка противовоспалительного эффекта соединения (I) в модели острого дерматита, который изучают при кожных воспалительных состояниях, таких как атопический дерматит (Dong et al., J Pharmacol Exp Ther, 2013, 344, 436).

Местное нанесение на кожу сложного форболового эфира ТРА вызывает воспалительный ответ, который характеризуется отеком и миграцией нейтрофилов в ранней фазе (2-24 ч) и пролиферацией клеток эпидермиса в поздней фазе (24-48 ч) (Griffiths et al., Agents and Actions, 1988, 25, 344-351). В данной модели самкам мышей Balb/c местно на ухо наносили основу или ТРА (2,5 мкг) в дозе 20 мкл. Для приготовления лекарственной формы в виде раствора, основу (DMSO:ацетон 1:7) или тестируемое соединение наносили местно за 30 мин до и через 15 мин после введения ТРА. Для лекарственной формы в виде мази, основу или соединение (I) (содержание 0,5%) наносили за 30 мин до ТРА. Состав мазевой основы приведен в табл. 10. Степень воспаления оценивали как изменение толщины уха через 6 ч после нанесения ТРА.

Результаты суммированы в табл. 11 и 12. При дозированном нанесении в виде раствора, соединение (I) (3-1000 мкг на ухо) ингибировало ТРА-индуцированное увеличение толщины уха зависимым от дозы образом. Наивысшая протестированная доза подавляла ответ на ТРА на 54,8%. При приготовлении мазевой лекарственной формы с концентрацией 0,5%, соединение (I) ингибировало ответ на ТРА на 34,9%.

Таблица 10. Композиция мазевой основы

|                                             |       |
|---------------------------------------------|-------|
| Октилгидроксистеарат                        | 5%    |
| C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub> триглицерид | 5%    |
| Вазелин (вазелиновое масло)                 | 79,5% |
| N-метилпирролидон                           | 5%    |
| Бензиловый спирт                            | 5%    |

Таблица 11. Эффект местного нанесения лекарственной формы соединения (I) в виде раствора на ТРА-индуцированное увеличение толщины уха у мышей

| Доза соединения (I)<br>(мкг на ухо в виде раствора) | Ингибирование ТРА-индуцированного увеличения<br>толщины уха (среднее ингибирование (%)±SEM (n)) |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 30                                                  | 6,6%±1,1% (12)                                                                                  |
| 100                                                 | 2,4%±0,7% (12)                                                                                  |
| 300                                                 | 35,5%±3,1% (12)                                                                                 |
| 1000                                                | 54,8±2,6% (12)                                                                                  |

Таблица 12. Эффект местного нанесения лекарственной формы соединения (I) в виде мази на ТРА-индуцированное увеличение толщины уха у мышей

| Доза соединения (I)<br>(20 мкг на ухо) | Ингибирование ТРА-индуцированного увеличения<br>толщины уха (среднее ингибирование (%)±SEM (n)) |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0,5% мазь                              | 34,9%±3,3% (12)                                                                                 |

Метод анализа 11: Ингибирование IL-2-стимулированного pSTAT5 в Т-клетках Tall-1

Способность тестируемых соединений ингибировать стимулированное интерлейкином-2 (IL-2) фосфорилирование STAT5 измеряли на линии Т-клеток человека Tall-1 (DSMZ) с использованием Al-phaLisa. Поскольку IL-2 передает сигналы через JAK1/3, этот клеточный метод анализа обеспечивает

измерение активности JAK1/3.

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

Линию Т-клеток человека Tall-1 культивировали при 37°C в кондиционированном 5% CO<sub>2</sub> инкубаторе в RPMI (Life Technologies) с добавлением 15% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (FBS, Life Technologies), 2 mM Glutamax (Life Technologies), 25 mM HEPES (Life Technologies) и 1× пенициллина/стрептомицина (Life Technologies). Соединения серийно разбавляли DMSO и дозировали акустическим способом по пустым лункам. Среду для анализа (DMEM без фенолового красного (Life Technologies), дополненную 10% FBS (ATCC)) дозировали (4 л/лунку), и перемешивали планшеты встряхиванием при 900 об/мин в течение 10 мин. Клетки высевали в количестве 45000 клеток на лунку в аналитическую среду (4 мкл на лунку) и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 1 ч с последующим добавлением IL-2 (R&D Systems; конечная концентрация 300 нг/мл) в предварительно нагретой аналитической среде (4 мкл) в течение 30 мин. После стимуляции цитокинами клетки лизировали 6 мкл 3× буферного раствора для лизиса AlphaLISA (PerkinElmer), содержащего 1× таблетки PhosStop и Complete (Roche). Лизат перемешивали встряхиванием при 900 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре (к.т.). Фосфорилированный STAT5 измеряли с помощью набора pSTAT5 AlphaLISA (PerkinElmer). Свежеприготовленную смесь акцепторных гранул вносили в лизат (5 мкл) при воздействии прошедшего через зеленый светофильтр света <100 люкс. Планшеты перемешивали встряхиванием при 900 об/мин в течение 2 мин, быстро осаждали центрифугированием и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре в темноте. Донорные гранулы (5 мкл) вносили при воздействии прошедшего через зеленый светофильтр света <100 люкс. Планшеты перемешивали встряхиванием при 900 об/мин в течение 2 мин, быстро осаждали центрифугированием и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре в темноте. Люминесценцию измеряли при возбуждении при 689 нм и испускании при 570 нм с использованием устройства для считывания планшет EnVision (PerkinElmer) при воздействии прошедшего через зеленый светофильтр света <100 люкс.

Для определения ингибирующей активности тестируемых соединений в ответ на IL-2, на линии Т-клеток человека измеряли среднюю интенсивность излучения гранул, связанных с pSTAT5. Значения IC<sub>50</sub> определяли из анализа кривых ингибирования интенсивности сигнала в зависимости относительно концентрации соединения. Данные выражали в виде значений pIC<sub>50</sub> (отрицательный десятичный логарифм IC<sub>50</sub>) (среднее значение ± стандартное отклонение). В данном методе анализа значение pIC<sub>50</sub> для соединения (I) составило 8,4.

Метод анализа 12: Ингибирование IL-12-индуцированного фосфорилирования STAT4 в CD3<sup>+</sup> Т-клетках человека

Этот клеточный метод анализа ингибирования JAK проводили путем измерения индуцированного интерлейкином-12 (IL-12, R&D Systems) фосфорилирования STAT4 в CD3<sup>+</sup> Т-клетках человека. Антитело к CD3 (Becton Dickinson (BD) Biosciences) конъюгировали с R-фикоэритрином (R-PE). Антитело к pSTAT4 (pTyr641, BD Biosciences) конъюгировали с Alexa Fluor 647.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека культивировали при 37°C в кондиционированном 5% CO<sub>2</sub> инкубаторе в среде RPMI (Life Technologies) с добавлением 10% FBS (Life Technologies), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Life Technologies) 2 mM GlutaMAX (Life Technologies), связанного с планшетом анти-CD3 антитела (5 мкг/мл, UCHT1, BD Biosciences) и растворимого анти-CD28 антитела (1 мкг/мл, CD28.2, BD Biosciences) в течение 3 суток. Затем клетки ресуспендировали в среде RPMI (Life Technologies) с добавлением 10% FBS (Life Technologies), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Life Technologies), 2 mM GlutaMAX (Life Technologies) и 10 нг/мл интерлейкина-2 (IL-2, R&D Systems) дополнительно в течение 3 суток. В день проведения анализа клетки промывали аналитическим буфером (RPMI с добавлением 0,1% бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Life Technologies) и 2 mM GlutaMAX (Life Technologies)) и ресуспендировали до 1,25×10<sup>6</sup> клеток на мл в аналитическом буфере. Клетки высевали в количестве 250000 клеток в 100 мкл на лунку в полипропиленовый 96-луночный глубокий круглодонный планшет (Corning) и оставляли для культивирования в течение 1 ч. Среду удаляли и заменяли 50 мкл аналитического буфера, содержащего dose-responses тестируемых соединений. Соединения приготавливали в виде 10 mM маточных растворов в DMSO. Выполняли серийные разбавления с получением 11 концентраций тестируемого соединения в 100% DMSO, 1000-кратных относительно конечной тестируемой концентрации. Их разбавляли в 25 раз, а затем в 20 раз аналитической средой с получением концентраций в 0,2% DMSO, 2-кратных относительно конечной тестируемой концентрации. Клетки инкубировали с тестируемыми соединениями при 37°C в течение 1 ч с последующим добавлением 50 мкл предварительно нагретого аналитического буфера, содержащего IL-12 (20 нг/мл, R&D Systems). Конечная концентрация IL-12 составила 10 нг/мл. После инкубации при 37°C в течение 30 мин клетки фиксировали 100 мкл предварительно нагретого буфера Cytofix (BD Biosciences) и инкубировали в течение 10 мин при 37°C. Затем клетки центрифугировали в течение 5 мин при 322×g, супернатант отбрасывали, и промывали клетки 500 мкл окрашивающего буфера (1% BSA в фосфатно-солевом буфере (PBS)). Затем клетки

центрифугировали в течение 5 мин при 322×g, супернатант отбрасывали и инкубировали клетки в течение 30 мин на льду с 500 мкл предварительно охлажденного буфера Perm III (BD Biosciences) для пермеабиллизации клеток. Затем клетки центрифугировали в течение 5 мин при 322×g, супернатант отбрасывали, промывали 1 мл окрашивающего буфера, еще раз центрифугировали и ресуспендировали конечный клеточный осадок в 100 мкл окрашивающего буфера, содержащего анти-CD3 антитело с R-PE (разбавление 1:10) и анти-STAT4 антитело с AlexaFluor 647 (разбавление 1:50) для окрашивания клеточной поверхности и внутриклеточных маркеров. Клетки инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре в темноте. После окрашивания антителами клетки центрифугировали в течение 5 мин при 322×g, супернатант отбрасывали и промывали клетки 500 мкл окрашивающего буфера. Клетки промывали еще один раз, после чего содержимое лунки переносили из аналитического планшета с глубокими лунками в 96-луночный полипропиленовый планшет с U-образным дном в 200 мкл окрашивающего буфера для проточного цитометрического анализа. Для анализа дозозависимого ответа на графике откладывали средние значения интенсивности флуоресценции относительно концентраций соединения и определяли значения IC<sub>50</sub> из четырехпараметрической робастной модели аппроксимации с использованием программного обеспечения Prism. В данном методе анализа значение pIC<sub>50</sub> для соединения (I) составило 7,2.

Метод анализа 13: Ингибирование IL-13-стимулированного фосфорилирования pSTAT6 в нормальных эпидермальных кератиноцитах человека

Способность тестируемых соединений ингибировать стимулированное интерлейкином-13 (IL-13) фосфорилирование STAT6 измеряли на нормальных эпидермальных кератиноцитах человека (ATCC) с использованием AlphaLisa. Фосфорилированный STAT6 измеряли с помощью набора AlphaLisa SureFire Ultra pSTAT6 (Tyr641) (PerkinElmer).

Первичные эпидермальные кератиноциты выращивали при 37°C в кондиционированном 5% CO<sub>2</sub> инкубаторе в минимальной среде для клеток дермы (ATCC), дополненной набором для роста кератиноцитов (ATCC) и 1× пенициллином/стрептомицином (Life Technologies). Клетки высевали с плотностью 20000 клеток на лунку в покрытые поли-D-лизином белые 384-луночные планшеты (Corning) с 50 мкл среды и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. В 2-е сутки анализа среду удаляли и заменяли 15 мл среды, содержащей dose-responses тестируемых соединений. Соединения серийно разбавляли DMSO, а затем дополнительно 1000-кратно разбавляли средой до получения конечной концентрации DMSO, равной 0,1%. Клетки инкубировали с тестируемыми соединениями при 37°C течение 1 ч, а затем добавляли IL-13 (R&D Systems; конечная концентрация 50 нг/мл) в предварительно нагретой аналитической среде (5 мкл) в течение 30 мин.

После стимуляции цитокином клетки лизировали 5 мкл 5× буфера AlphaLisa (PerkinElmer), содержащего 1× таблетки PhosStop и Complete (Roche). Лизат перемешивали встряхиванием при 900 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре (к.т.). Фосфорилированный STAT6 измеряли с помощью набора pSTAT6 AlphaLisa (PerkinElmer). Свежеприготовленную смесь акцепторных гранул вносили в лизат (10 мкл) при воздействии прошедшего через зеленый светофильтр света <100 люкс. Планшеты перемешивали встряхиванием при 900 об/мин в течение 2 мин, быстро осаждали центрифугированием и инкубировали в течение 2 ч при к.т. в темноте. Донорные гранулы (10 мкл) вносили при воздействии прошедшего через зеленый светофильтр света <100 люкс. Планшеты перемешивали встряхиванием при 900 об/мин в течение 2 мин, быстро осаждали центрифугированием и инкубировали в течение ночи при к.т. в темноте. Люминесценцию измеряли при возбуждении при 689 нм и испускании при 570 нм с использованием устройства для считывания планшет EnVision (PerkinElmer) при воздействии прошедшего через зеленый светофильтр света <100 люкс.

Регистрировали значения люминесценции и использовали их для расчета значений выраженного в процентах ингибирования относительно DMSO и контролей. Для анализа дозозависимого ответа, на графике откладывали данные выраженного в процентах ингибирования относительно концентраций соединения, и определяли значения IC<sub>50</sub> из четырехпараметрической робастной модели аппроксимации с использованием программного обеспечения Prism. В данном методе анализа значение pIC<sub>50</sub> для соединения (I) составило 8,3.

Метод анализа 14: Ингибирование IL-22-стимулированного фосфорилирования pSTAT3 в нормальных эпидермальных кератиноцитах человека

Способность тестируемых соединений ингибировать стимулированное интерлейкином-22 (IL-22) фосфорилирование STAT3 измеряли на нормальных эпидермальных кератиноцитах человека (ATCC) с использованием AlphaLisa. Фосфорилированный STAT3 измеряли с помощью набора AlphaLisa SureFire Ultra pSTAT3 (Tyr705) (PerkinElmer).

Первичные эпидермальные кератиноциты выращивали при 37°C в кондиционированном 5% CO<sub>2</sub> инкубаторе в минимальной среде для клеток дермы (ATCC), дополненной набором для роста кератиноцитов (ATCC) и 1× пенициллином/стрептомицином (Life Technologies). Клетки высевали с плотностью 20000 клеток на лунку в покрытые поли-D-лизином белые 384-луночные планшеты (Corning) с 50 мкл среды и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. В 2-е сутки анализа среду удаляли и заменяли 15 мл среды, содержащей исследуемую в отношении ответа дозу тестируемых соединений. Соединения

серийно разбавляли DMSO, а затем дополнительно 1000-кратно разбавляли средой до получения конечной концентрации DMSO, равной 0,1%. Клетки инкубировали с тестируемыми соединениями при 37°C в течение 1 ч, а затем добавляли IL-22 (R&D Systems; конечная концентрация 50 нг/мл) в предварительно нагретой аналитической среде (5 мкл) в течение 30 мин.

После стимуляции цитокином, клетки лизировали 5 мкл 5× буфера AlphaLisa (PerkinElmer), содержащего 1× таблетки PhosStop и Complete (Roche). Лизат перемешивали встряхиванием при 900 об/мин в течение 10 минут при комнатной температуре (к.т.). Фосфорилированный STAT3 измеряли с помощью набора pSTAT3 AlphaLisa (PerkinElmer). Свежеприготовленную смесь акцепторных гранул вносили в лизат (10 мкл) при воздействии прошедшего через зеленый светофильтр света <100 люкс. Планшеты перемешивали встряхиванием при 900 об/мин в течение 2 мин, быстро осаждали центрифугированием и инкубировали в течение 2 ч при к.т. в темноте. Донорные гранулы (10 мкл) вносили при воздействии прошедшего через зеленый светофильтр света <100 люкс. Планшеты перемешивали встряхиванием при 900 об/мин в течение 2 мин, быстро осаждали центрифугированием и инкубировали в течение ночи при к.т. в темноте. Люминесценцию измеряли при возбуждении при 689 нм и испускании при 570 нм с использованием устройства для считывания планшет EnVision (PerkinElmer) при воздействии прошедшего через зеленый светофильтр света <100 люкс.

Регистрировали значения люминесценции, и использовали их для расчета значений выраженного в процентах ингибирования относительно DMSO и контролей. Для анализа дозозависимого ответа, на графике откладывали данные выраженного в процентах ингибирования относительно концентраций соединения, и определяли значения  $IC_{50}$  из четырехпараметрической робастной модели аппроксимации с использованием программного обеспечения Prism. В данном методе анализа значение  $pIC_{50}$  для соединения (I) составило 8,4.

Метод анализа 15: Восстановление IL-22-супрессированного филагрина в нормальных эпидермальных кератиноцитах человека

Известно, что IL-22 ингибирует экспрессию генов конечной дифференцировки, таких как ген филагрина. Степень восстановления тестируемым соединением супрессированной интерлейкином-22 (IL-22) экспрессии гена филагрина измеряли в нормальных эпидермальных кератиноцитах человека (ATCC) с использованием метода ПЦР в реальном времени.

Первичные эпидермальные кератиноциты культивировали при 37°C в кондиционированном 5% CO<sub>2</sub> инкубаторе в минимальной среде для клеток дермы (ATCC), дополненной набором для роста кератиноцитов (ATCC) и 1× пенициллином/стрептомицином (Life Technologies). Клетки высевали с плотностью 5000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты BioCoat (Corning) в объеме 100 мкл и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 3-4 дней до конfluence 100%. Затем среду удаляли и заменяли 150 мкл среды, содержащей исследуемую в отношении ответа дозу тестируемых соединений. Соединения серийно разбавляли DMSO, а затем дополнительно 1000-кратно разбавляли средой до получения конечной концентрации DMSO, равной 0,1%. В 1-е сутки анализа, клетки инкубировали с тестируемыми соединениями при 37°C в течение 1 ч, после чего добавляли IL-22 (R&D Systems; конечная концентрация 50 нг/мл) в предварительно нагретой среде (50 мкл) в течение 4 дней. Среду с тестируемыми соединениями и IL-22 меняли один раз на 3-и сутки. На 5-е сутки клетки промывали 1× PBS (Gibco) и лизировали с помощью 50 мкл лизирующего буфера, содержащего 0,5 мкл ДНКазы I из набора TaqMan® Gene Expression Cells-to-Ct™ (Life Technologies). После инкубации при комнатной температуре (к.т.) в течение 5 мин добавляли 5 мкл стоп-раствора из набора, а затем инкубировали при к.т. в течение 2 мин. Смешивали 11,25 мкл лизата, 12,5 мкл 2× буфера RT и 1,25 мкл 20× RT смеси ферментов из набора. Реакцию обратной транскрипции проводили путем инкубирования смеси при 37°C в течение 60 мин, а затем при 95°C в течение 5 мин для получения cDNA. Для формирования коктейля для PCR каждая реакционная смесь содержала 10 мкл 2× TaqMan® Gene Expression Master Mix, 1 мкл 2× TaqMan® Filaggrin Gene Expression Assay (Life Technologies), 1 мкл 2× TaqMan® UBC Gene Expression Assay (Life Technologies), 4 мкл воды без нуклеазной активности и 4 мкл cDNA. Реакцию PCR проводили на StepOnePlus™ (Life Technologies) с циклическими условиями: 50°C в течение 2 мин, 95°C в течение 10 мин, затем 40 циклов при 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 1 мин. После каждого цикла регистрировали сигналы флуоресценции. Сравнительный метод  $C_T$  использовали для количественной оценки экспрессии генов в клетках без IL-22 и тестируемых соединений в качестве фонового контроля.

Восстановление соединения (I) для супрессированной интерлейкином-22 (IL-22) экспрессии гена филагрина наблюдали при концентрации <1 мкМ.

Метод анализа 16: Анализ проницаемости клеток Caco-2

Анализ проницаемости клеток Caco-2 использовали в качестве показателя проницаемости кожи. В данном методе анализа измеряется скорость, с которой тестируемые соединения в растворе проникают в клеточный монослой (сконструированный для имитации плотного соединения монослоев тонкого кишечника человека).

24-луночные трансвелл-планшеты CacoReady приобретали от ADMecell (Alameda, CA). Соединения оценивали при концентрации 5 мкл, полученной из 10 мМ маточных растворов в DMSO, в двух по-

вторых (n=2). Пассивную проницаемость тестируемых соединений оценивали с использованием монослоев клеток Caco-2 вместе с верапамилом (25 мкл) для ингибирования транспортных белков P-гр в направлении от апикального к базолатеральному (А-В). Эксперимент проводили в инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Среда для культивирования Caco-2 состояла из стандартного отфильтрованной среды DMEM, 10% FCS, 1% L-глутамин и 1% PenStrep. Планшет для анализа фона получали путем добавления 750 мкл транспортного буфера в лунки А-В. Планшет CacoReady™ получали путем удаления среды Caco-2 из апикальных лунок и замены ее свежей транспортной средой (повтор 3 промываний 200 мкл). Затем среду холостой пробы (200 мкл) заменяли разбавленным соединением для лунок А-В. Для начала инкубации, планшет для анализа фона вынимали из инкубатора, и добавляли апикальную секцию поверх нее. Образцы (40 мкл) отбирали из апикального и базального отделов на нулевой момент времени (t<sub>0</sub>). Образцы снова собирали через 120 мин (t<sub>120</sub>) из апикального и базального отделов. Все образцы разбавляли и подготавливали для биоанализа методом LC-MS/MS анализа.

Коэффициент проницаемости (K<sub>p</sub>, среднее значение от А до В+P<sub>аpаrаmеt</sub> верапамила) в см/с рассчитывали как dQ (поток)/(dt × площадь × концентрация).

В данном методе анализе предполагается, что соединение со значением K<sub>p</sub> приблизительно менее 5×10<sup>-6</sup> см/с имеет низкую проницаемость. Предполагается, что соединение со значением K<sub>p</sub> приблизительно более 20×10<sup>-6</sup> см/с, обладает высокой проницаемостью.

Метод анализа 17: Анализ на микросомах печени человека

Цель данного анализа заключалась в оценке метаболической стабильности тестируемых соединений в субфракции печени человека *in vitro*. Микросомы печени человека, приобретенные от Bioreclamation-IVT (Baltimore, MD), размораживали на льду и разбавляли 0,1 М калий-фосфатным буфером pH 7,4 для получения конечных инкубационных концентраций белка 0,1 мг/мл. Испытуемые соединения (10 мМ) разбавляли в кофакторе NADPH с получением конечных инкубационных концентраций 0,1 мкМ для тестируемого соединения и 1 мМ для NADPH. Инкубацию проводили при температуре 37°C, и отбирали аликвоты для испытаний в моменты времени 0, 5, 8, 15, 30 и 45 мин. Каждую аликвоту добавляли в воду с 3% муравьиной кислотой и 1 мкМ внутренним стандартом. Полученные образцы вводили в LC-MS/MS систему для анализа.

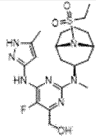
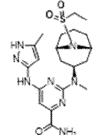
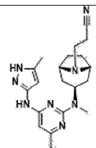
Для каждой инкубации площадь пика аналитов в каждой аликвоте t<sub>0</sub> принимали за 100%, а площади пиков аликвот в последующие моменты времени преобразовывали в выраженное в процентах содержание оставшегося исходного соединения относительно t<sub>0</sub>. Выраженное в процентах содержание оставшегося исходного соединения преобразовывали в натуральный логарифмический масштаб и откладывали на графике относительно времени в минутах. Проводили линейный регрессионный анализ для оценки начального наклона профиля расходования исходного вещества и определения формулы для линии наилучшего соответствия. Наклон полученной линии нормировали к концентрации белка в мг/мл или количеству клеток/мл, и рассчитывали CL<sub>int</sub> для микросом печени следующим образом:

$$CL_{int} (\text{мкл} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}) = (\text{наклон} \times 1000) / [\text{белок}, \text{мг/мл}]$$

Значения CL<sub>int</sub> от 0 до 8 мкл/мин/мг характеризуют низкий клиренс (т.е. <30% кровотока печени человека). Значения CL<sub>int</sub> от 9 до 49 мкл/мин/мг характеризуют умеренный клиренс (т.е. 30-70% кровотока печени человека) и значения >50 мкл/мин/мг характеризуют высокий клиренс (т.е. >70% кровотока печени человека).

### Охарактеризация соединения (I) и соединений сравнения

Таблица 13. Охарактеризация соединений сравнения

| Соединение # | Структура                                                                           | Caco <sub>2</sub> K <sub>p</sub><br>10 <sup>-6</sup> см/с | HLM CL <sub>int</sub><br>мкл/мин/мг |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| (I)          |  | 42,3                                                      | 136                                 |
| C-1          |  | 3,55                                                      | 6                                   |
| C-2          |  | 5,5                                                       | 12                                  |

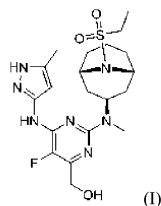
Соединения сравнения C-1 и C-2 раскрыты заявителем в нескольких презентациях, сделанных на конференциях в апреле, июне и августе 2017 г.

Соединение (I) характеризуется значительно более высокой проницаемостью (значение  $C_{soverap}$ ) и клиренсом в микросомах печени человека (значение  $HLM Cl_{int}$ ), чем C-1 и C-2. Более высокий клиренс является благоприятным для ускорения системного клиренса и предупреждения системного воздействия, которое может быть ассоциировано с побочными эффектами. Более высокая проницаемость является благоприятной при показаниях к применению на коже, поскольку она, по-видимому, обеспечивает лучшее проникновение в кожу.

Хотя настоящее изобретение было описано со ссылкой на его конкретные аспекты или варианты осуществления, специалистам в данной области техники следует понимать, что без отступления от сущности и объема настоящего изобретения могут быть внесены различные изменения или проведены замены эквивалентов. Кроме того, в случаях, установленных действующими патентными законами и регулирующими документами, все публикации, патенты и патентные заявки, процитированные в настоящем документе, включены во всей своей полноте в настоящий документ посредством ссылки в равной мере, как если бы каждый документ был индивидуально включен в настоящий документ посредством ссылки.

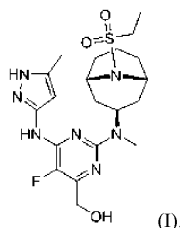
## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

### 1. Соединение формулы (I)

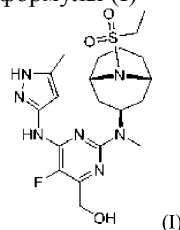


или его фармацевтически приемлемая соль.

### 2. Соединение формулы (I)



### 3. Кристаллическая форма соединения формулы (I)



где кристаллическая форма характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, содержащей дифракционные пики при значениях  $2\theta$ , равных  $11,4 \pm 0,2$ ,  $16,2 \pm 0,2$ ,  $16,6 \pm 0,2$ ,  $17,7 \pm 0,2$  и  $21,9 \pm 0,2$ .

4. Кристаллическая форма по п.3, где порошковая рентгеновская дифрактограмма дополнительно содержит дифракционные пики при значениях  $2\theta$ , равных  $8,9 \pm 0,2$ ,  $9,5 \pm 0,2$  и  $10,2 \pm 0,2$ .

5. Кристаллическая форма по п.4, где порошковая рентгеновская дифрактограмма дополнительно содержит два или более дополнительных дифракционных пиков при значениях  $2\theta$ , выбранных из  $14,4 \pm 0,2$ ,  $19,0 \pm 0,2$ ,  $19,2 \pm 0,2$ ,  $19,8 \pm 0,2$ ,  $20,1 \pm 0,2$ ,  $20,4 \pm 0,2$ ,  $20,6 \pm 0,2$ ,  $20,8 \pm 0,2$ ,  $21,3 \pm 0,2$ ,  $25,9 \pm 0,2$ ,  $30,1 \pm 0,2$ ,  $30,5 \pm 0,2$ ,  $30,9 \pm 0,2$ ,  $32,6 \pm 0,2$  и  $33,8 \pm 0,2$ .

6. Кристаллическая форма по п.3, где кристаллическая форма характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, в которой положения пиков по существу соответствуют положениям пиков дифрактограммы, представленной на фиг. 5.

7. Кристаллическая форма по п.3, где кристаллическая форма характеризуется кривой дифференциальной сканирующей калориметрии, записанной при скорости нагревания  $10^\circ\text{C}$  в минуту, с максимумом эндотермического теплового потока при температуре  $238,1^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .

8. Кристаллическая форма по п.3, где кристаллическая форма характеризуется кривой дифференциальной сканирующей калориметрии, по существу соответствующей кривой, представленной на фиг. 6.

9. Фармацевтическая композиция для лечения воспалительного или аутоиммунного кожного заболевания у млекопитающего, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль по любому из пп.1 или 2 и фармацевтически приемлемый носитель.

10. Фармацевтическая композиция для лечения воспалительного или аутоиммунного кожного заболевания у млекопитающего, содержащая кристаллическую форму соединения формулы (I) по любому из

пп.3-8 и фармацевтически приемлемый носитель.

11. Фармацевтическая композиция по п.9, дополнительно содержащая одно или несколько дополнительных терапевтических средств, предназначенных для лечения воспалительного кожного заболевания.

12. Фармацевтическая композиция по п.9, где фармацевтическая композиция представляет собой мазь или крем.

13. Фармацевтическая композиция по п.9, где соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль присутствует в диапазоне от 0,1 до 10 мас. %.

14. Фармацевтическая композиция по п.9, где соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль присутствует в диапазоне от 0,25 до 5 мас. %.

15. Фармацевтическая композиция по п.9, где соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль присутствует в диапазоне от 0,05 до 0,5 мас. %.

16. Применение соединения по п.1 или 2 для лечения воспалительного или аутоиммунного кожного заболевания у млекопитающего.

17. Применение по п.16 для лечения воспалительного кожного заболевания у млекопитающего.

18. Применение по п.17 для лечения атопического дерматита.

19. Применение по п.18, где атопический дерматит представляет собой атопический дерматит с умеренной и тяжелой степенью выраженности.

20. Применение по п.18, где атопический дерматит представляет собой атопический дерматит с легкой и умеренной степенью выраженности.

21. Применение по п.16 для лечения гнездной алопеции.

22. Применение по п.16 для лечения воспалительного или аутоиммунного кожного заболевания, выбранного из группы, состоящей из витилиго, узловатой чесотки, красного плоского лишая, контактного дерматита, кожных проявлений реакции "трансплантат против хозяина", пемфигоида, дискоидной волчанки, склерозирующего лишая, плоского фолликулярного лишая, псориаза и декарвирующего фолликулита.

23. Применение соединения по п.1 или 2 при производстве лекарственного средства для лечения воспалительного или аутоиммунного кожного заболевания у млекопитающего.

24. Применение по п.23 при производстве лекарственного средства для лечения воспалительного кожного заболевания у млекопитающего.

25. Применение по п.24, где воспалительное кожное заболевание представляет собой атопический дерматит.

26. Применение по п.25, где атопический дерматит представляет собой атопический дерматит с умеренной и тяжелой степенью выраженности.

27. Применение по п.25, где атопический дерматит представляет собой атопический дерматит с легкой и умеренной степенью выраженности.

28. Применение по п.23 при производстве лекарственного средства для лечения аутоиммунного кожного заболевания у млекопитающего.

29. Применение по п.28, где кожное заболевание представляет собой гнездную алопецию.

30. Применение по п.23, где воспалительное или аутоиммунное кожное заболевание выбирают из группы, состоящей из витилиго, узловатой чесотки, красного плоского лишая, контактного дерматита, кожных проявлений реакции "трансплантат против хозяина", пемфигоида, дискоидной волчанки, склерозирующего лишая, плоского фолликулярного лишая, псориаза и декарвирующего фолликулита.

31. Способ лечения воспалительного или аутоиммунного кожного заболевания у млекопитающего, причем способ включает в себя введение млекопитающему соединения по п.1 или 2.

32. Способ по п.31, где соединение вводят в кожу млекопитающего в фармацевтической композиции, содержащей соединение и фармацевтически приемлемый носитель.

33. Способ по п.31, где воспалительное или аутоиммунное кожное заболевание представляет собой воспалительное кожное заболевание.

34. Способ по п.33, где воспалительное кожное заболевание представляет собой атопический дерматит.

35. Способ по п.34, где атопический дерматит представляет собой атопический дерматит с умеренной и тяжелой степенью выраженности.

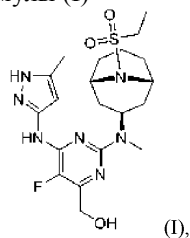
36. Способ по п.34, где атопический дерматит представляет собой атопический дерматит с легкой и умеренной степенью выраженности.

37. Способ по п.31, где воспалительное или аутоиммунное кожное заболевание представляет собой аутоиммунное кожное заболевание.

38. Способ по п.37, где аутоиммунное кожное заболевание представляет собой гнездную алопецию.

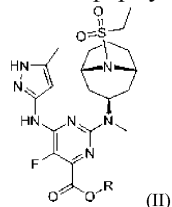
39. Способ по п.31, где воспалительное или аутоиммунное кожное заболевание выбирают из группы, состоящей из витилиго, узловатой чесотки, красного плоского лишая, контактного дерматита, кожных проявлений реакции "трансплантат против хозяина", пемфигоида, дискоидной волчанки, склерозирующего лишая, плоского фолликулярного лишая, псориаза и декарвирующего фолликулита.

40. Способ получения соединения формулы (I)



включающий:

(a) осуществление взаимодействия соединения формулы (II)



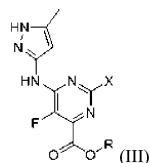
где R представляет собой C<sub>1-12</sub>алкильную группу, с восстановителем с получением соединения формулы (I).

41. Способ по п.40, дополнительно включающий стадию формирования фармацевтически приемлемой соли соединения формулы (I).

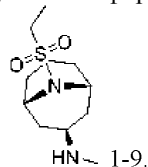
42. Способ по п.40, где восстановитель выбирают из группы, состоящей из LiAlH<sub>4</sub>, NaBH<sub>4</sub> и LiBH<sub>4</sub>.

43. Способ по п.40, где R представляет собой этил.

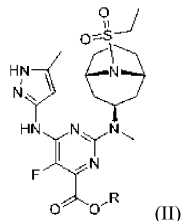
44. Способ по п.40, где соединение формулы (II) получают путем сочетания соединения формулы (III)



где X представляет собой галоген, с соединением формулы 1-9



45. Соединение формулы (II)

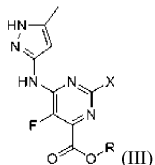


или его фармацевтически приемлемая соль,

где R представляет собой C<sub>1-12</sub>алкильную группу.

46. Соединение по п.45, где R представляет собой этил.

47. Соединение формулы (III)



или его фармацевтически приемлемая соль,

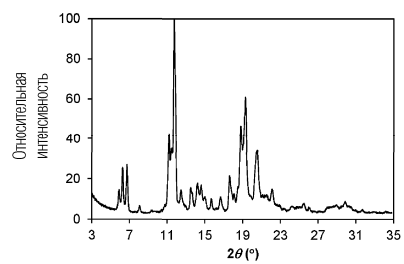
где R представляет собой C<sub>1-12</sub>алкильную группу и

X представляет собой галоген.

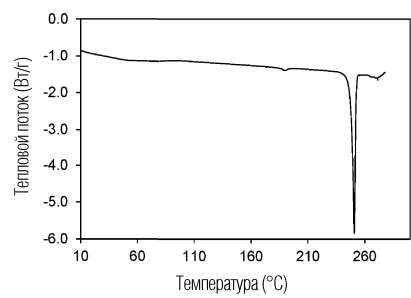
48. Соединение по п.47, где R представляет собой этил и

X представляет собой хлор.

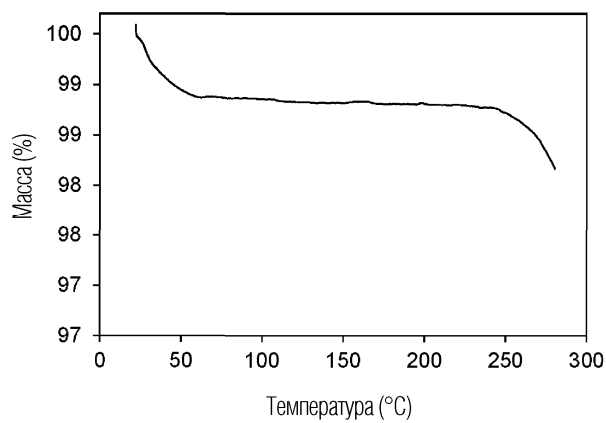
041115



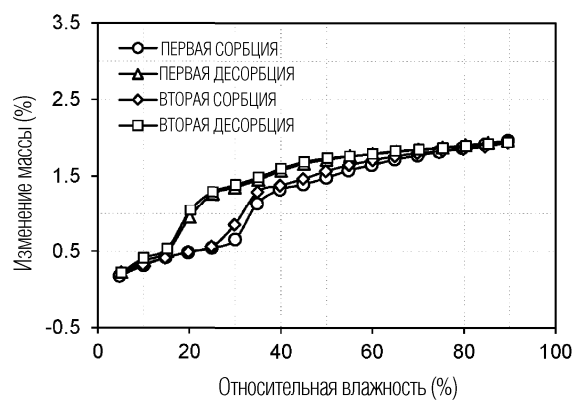
Фиг. 1



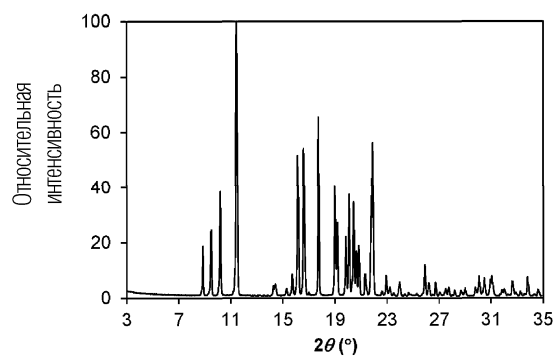
Фиг. 2



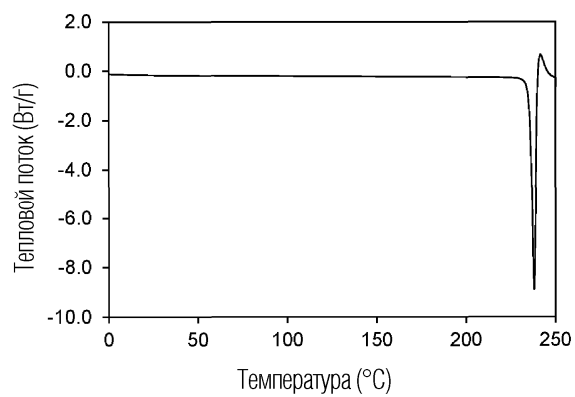
Фиг. 3



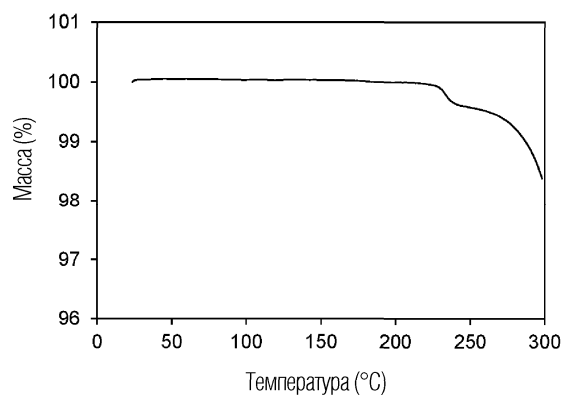
Фиг. 4



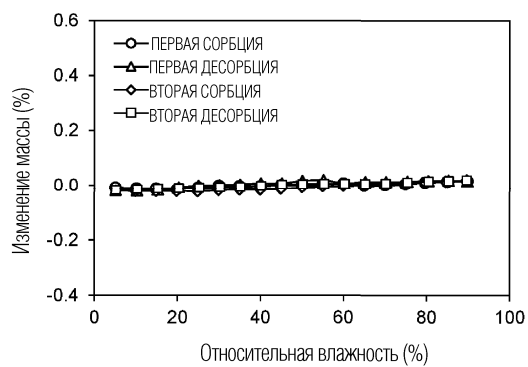
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

