

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202292481 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.11.01

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

(22) Дата подачи заявки  
2021.03.01

(54) КРИСТАЛЛОГИДРАТ СОЕДИНЕНИЯ-ИНГИБИТОРА JAK

(31) 62/983,931

(72) Изобретатель:

(32) 2020.03.02

Фэсс Джин Тимоти (US)

(33) US

(74) Представитель:

(86) PCT/US2021/070207

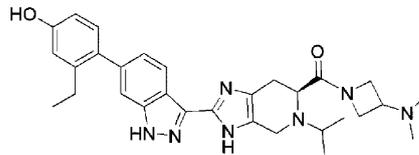
Медведев В.Н. (RU)

(87) WO 2021/178991 2021.09.10

(71) Заявитель:

ТЕРЕВАНС БАЙОФАРМА Ар энд Ди  
АйПи, ЭлЭлСи (US)

(57) В изобретении представлен кристаллогидрат соединения формулы 1



Также в изобретении представлены фармацевтические композиции, включающие такой кристаллогидрат, способы применения такого кристаллогидрата для лечения респираторных заболеваний и способы, полезные для получения такого кристаллогидрата.

A1

202292481

202292481

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575411EA/081

### КРИСТАЛЛОГИДРАТ СОЕДИНЕНИЯ-ИНГИБИТОРА JAK

#### **Предпосылки создания изобретения**

##### Область техники, к которой относится изобретение

В настоящей заявке представлена форма кристаллогидрата соединения-ингибитора JAK, полезного для лечения респираторных и других заболеваний. Также в настоящей заявке представлены фармацевтические композиции, включающие такую кристаллическую форму, способы применения кристаллической формы для лечения, например, респираторных заболеваний, и способы, полезные для получения такой кристаллической формы.

##### Уровень техники

Цитокины представляют собой межклеточные сигнальные молекулы, которые включают хемокины, интерфероны, интерлейкины, лимфокины и фактор некроза опухоли. Цитокины имеют решающее значение для нормального роста клеток и иммунорегуляции, но также вызывают иммуноопосредованные заболевания и способствуют росту злокачественных клеток. Повышенные уровни многих цитокинов вовлечены в патологию большого числа заболеваний или состояний, особенно тех заболеваний, которые характеризуются воспалением. Многие из цитокинов, вовлеченных в заболевание, действуют через сигнальные пути, зависящие от семейства тирозинкиназ Janus (JAK), которые передают сигналы через семейство транскрипционных факторов - переносчиков сигнала и активаторов транскрипции (STAT).

Семейство JAK включает четыре члена: JAK1, JAK2, JAK3 и тирозинкиназу 2 (TYK2). Связывание цитокина с JAK-зависимым цитокиновым рецептором индуцирует димеризацию рецептора, что приводит к фосфорилированию тирозиновых остатков на JAK-киназе, вызывая активацию JAK. Фосфорилированные JAK, в свою очередь, связывают и фосфорилируют различные белки STAT, которые димеризуются, интернализуются в клеточном ядре и непосредственно модулируют транскрипцию генов, что приводит, среди прочего, к последующим эффектам, связанным с воспалительным заболеванием. JAK обычно связываются с цитокиновыми рецепторами парами в виде гомодимеров или гетеродимеров. Конкретные цитокины ассоциируются с конкретными парами JAK. Каждый из четырех членов семейства JAK участвует в передаче сигналов по меньшей мере одного из цитокинов, связанных с воспалением.

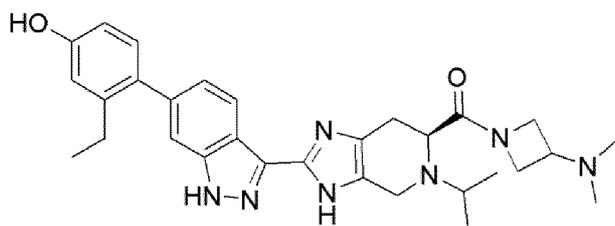
Астма представляет собой хроническое заболевание дыхательных путей, от которого не существует ни профилактики, ни лечения. Заболевание характеризуется воспалением, фиброзом, гиперчувствительностью и ремоделированием дыхательных путей, что способствует ограничению воздушного потока. Около 300 миллионов человек во всем мире страдают астмой, и предполагают, что к 2025 году число людей, страдающих астмой, вырастет более чем на 100 миллионов. Хотя большинство пациентов могут контролировать симптомы астмы с использованием ингаляционных кортикостероидов,

которые можно комбинировать с модификатором лейкотриенов и/или бета-агонистом длительного действия, остается субпопуляция пациентов с тяжелой астмой, у которых заболевание не контролируется традиционными терапиями. Цитокины, участвующие в астматическом воспалении, которые передают сигнал через путь JAK-STAT, включают IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-13, IL-23, IL-31, IL-27, тимический стромальный лимфопоэтин (TSLP), интерферон- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). Воспаление дыхательных путей характерно не только для астмы, но и для других респираторных заболеваний. Хроническая обструктивная болезнь легких (COPD), кистозный фиброз (CF), пневмонит, интерстициальные заболевания легких (включая идиопатический легочный фиброз), острое поражение легких, острый респираторный дистресс-синдром, бронхит, эмфизема и облитерирующий бронхиолит также являются заболеваниями дыхательных путей, патофизиология которых, как полагают, связана с JAK-сигнальными цитокинами.

JAK-сигнальные цитокины также играют важную роль в активации Т-клеток, подтипа иммунных клеток, который играет центральную роль во многих иммунных процессах. Патологическая активация Т-клеток имеет решающее значение в этиологии множественных респираторных заболеваний. Аутореактивные Т-клетки играют роль в облитерирующем бронхиолите с организующейся пневмонией (также называемом COS). Подобно COS, этиология отторжений легочного трансплантата связана с aberrантной Т-клеточной активацией Т-клеток реципиента трансплантированным донорским легким. Отторжения легочного трансплантата могут происходить на ранней стадии как первичная дисфункция трансплантата (PGD), организующаяся пневмония (OP), острое отторжение (AR) или лимфоцитарный бронхиолит (LB), или они могут возникнуть спустя годы после трансплантации легкого как хроническая дисфункция аллотрансплантата легкого (CLAD). CLAD ранее была известна как облитерирующий бронхиолит (BO), но теперь считается синдромом, который может иметь различные патологические проявления, включая BO, рестриктивную CLAD (rCLAD или RAS) и нейтрофильную дисфункцию аллотрансплантата. Хроническая дисфункция аллотрансплантата легкого (CLAD) представляет собой серьезную проблему при длительном лечении реципиентов трансплантата легкого, поскольку она приводит к постепенной потере функциональности пересаженного легкого (Gauthier et al., *Curr. Transplant. Rep.*, **2016**, 3(3), 185-191). CLAD плохо поддается лечению, поэтому сохраняется потребность в эффективных соединениях, способных предотвращать или лечить это состояние. Некоторые JAK-зависимые цитокины, такие как IFN $\gamma$  и IL-5, активируются при CLAD и отторжении легочного трансплантата (Berastegui et al, *Clin. Transplant.* **2017**, 31, e12898). Более того, высокие уровни хемокинов CXCR3 в легких, таких как CXCL9 и CXCL10, которые находятся на пути ниже JAK-зависимой передачи сигналов IFN, связаны с худшими исходами у пациентов с трансплантацией легких (Shino et al, *PLOS One*, **2017**, 12 (7), e0180281). Было показано, что системное ингибирование JAK эффективно при отторжении почечного трансплантата (Vicenti et al., *American Journal of Transplantation*, **2012**, 12, 2446-56).

Следовательно, ингибиторы JAK потенциально могут быть эффективными для предотвращения или замедления отторжения легочного трансплантата и CLAD. Сходные события активации Т-клеток, описанные в качестве основы для отторжения легочного трансплантата, также считаются основной движущей силой реакции легочного трансплантата против хозяина (GVHD), которая может возникнуть после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Подобно CLAD, легочный GVHD является хроническим прогрессирующим заболеванием с крайне неблагоприятными исходами, и в настоящее время нет одобренных лечений. Ретроспективное многоцентровое обзорное исследование 95 пациентов со стероид-резистентной острой или хронической GVHD, получавших системный ингибитор JAK руксолитиниб в качестве терапии спасения, продемонстрировало полный или частичный ответ на руксолитиниб у большинства пациентов, включая пациентов с реакцией легочный GVHD (Zeiser et al, *Leukemia*, **2015**, 29, 10, 2062-68).

В принадлежащей тому же правообладателю заявке США с серийным номером 16/559077, поданной 3 сентября 2019 г., описаны некоторые диметиламиноазетидинамидные соединения, полезные в качестве ингибиторов JAK. В частности, соединение (S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-c]пиридин-6-ил)метанон (соединение **1**):



### 1

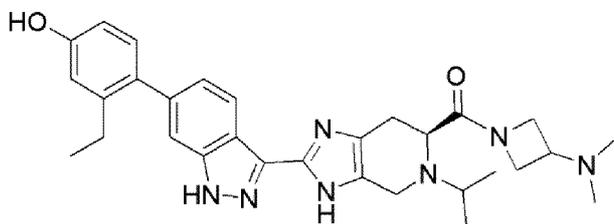
конкретно раскрывается в заявке как сильнодействующий несистемный ингибитор ran-JAK, подходящий для лечения, профилактики и/или замедления развития воспалительных респираторных заболеваний, включая астму и отторжение легочного трансплантата.

Для эффективного использования этого соединения в качестве терапевтического средства было бы желательно иметь кристаллическую форму твердого вещества. Например, было бы крайне желательно иметь физическую форму, термически стабильную при достаточно высокой температуре, что облегчало бы обработку и хранение вещества. Кристаллические твердые вещества обычно предпочтительнее аморфных форм для повышения чистоты и стабильности производимого продукта. Однако образование кристаллических форм органических соединений весьма непредсказуемо. Не существует надежных методов для предсказания того, какая форма органического соединения, если таковая имеется, будет кристаллической. Кроме того, не существует методов для предсказания того, какая кристаллическая форма, если таковая имеется, будет иметь

физические свойства, желательные для использования в качестве фармацевтических средств. Соответственно, существует потребность в кристаллических формах соединения **1**.

### **Сущность изобретения**

В настоящей заявке представлен кристаллогидрат соединения формулы **1**:



### **1**

Также в настоящей заявке представлены фармацевтические композиции, включающие кристаллогидрат по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В настоящей заявке представлен способ получения кристаллогидрата по настоящему изобретению, а также способы лечения, профилактики, отсрочки и/или облегчения заболеваний, поддающихся лечению ингибитором JAK, в частности, респираторных заболеваний и отторжения легочного трансплантата.

Также в настоящей заявке представлены применения формы кристаллогидрата в лекарственной терапии и в изготовлении состава или лекарственного средства для лечения, профилактики, отсрочки и/или облегчения заболеваний, поддающихся лечению ингибитором JAK, в частности, респираторных заболеваний и отторжения легочного трансплантата.

### **Краткое описание чертежей**

Различные аспекты настоящего изобретения проиллюстрированы посредством ссылки на прилагаемые чертежи.

Фиг. 1 показывает порошковую рентгеновскую дифракторграмму (PXRD) кристаллогидрата соединения **1**.

Фиг. 2 показывает термограмму дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) кристаллогидрата соединения **1**.

Фиг. 3 показывает график термогравиметрического анализа (TGA) кристаллогидрата соединения **1**.

Фиг. 4 показывает изотерму динамической сорбции влаги (DMS) кристаллогидрата соединения **1**, наблюдаемую при температуре около 25°C.

### **Подробное описание изобретения**

#### Определения

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

указано иное.

Термин "около" означает  $\pm 5$  процентов от указанного значения.

Термин "гидрат" означает комплекс или агрегат, обычно в кристаллической форме, образованный молекулами воды и соединением по настоящему изобретению, где отношение молекул воды к молекулам соединения может составлять 1:1, менее чем 1:1 или более чем 1:1.

Термин "по существу" в отношении, например, рентгеновской дифрактограммы, кривой DSC или кривой TGA, включает диаграмму или кривую, которая не обязательно идентична показанным в настоящей заявке, но которая попадает в пределы экспериментальной ошибки или отклонения при рассмотрении специалистом в данной области техники.

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

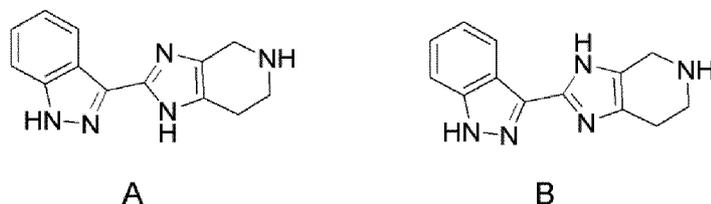
Термин "лечащий" или "лечение" означает облегчение или подавление медицинского состояния, заболевания или расстройства, подлежащего лечению (например, респираторного заболевания) у пациента (в частности, у человека); или облегчение симптомов медицинского состояния, заболевания или расстройства.

Следует отметить, что формы единственного числа "a", "an", "one" и "the", используемые в описании и прилагаемой формуле изобретения, могут включать ссылки во множественном числе, если содержание явно не требует иного.

#### Соглашение о названиях

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

Кроме того, имидазо-часть тетрагидроимидазопиридиновой группы в структуре соединения **1** существует в таутомерных формах, как показано ниже для фрагмента соединения Примера **1**

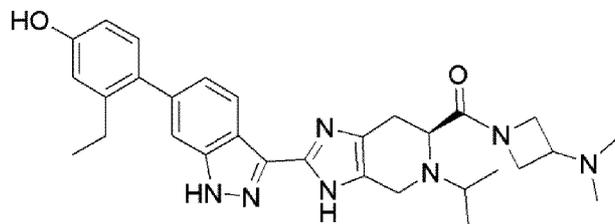


В соответствии с соглашением IUPAC эти представления приводят к различной нумерации атомов имидазольной части: (S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-c]пиридин-6-ил)метанон (структура A) по сравнению с (S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-

изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-ил)метаноном (структура В). Следует понимать, что хотя структуры показаны или названы в конкретной форме, изобретение также включает их таутомер.

### Кристаллическая форма соединения 1

В настоящей заявке представлен кристаллогидрат (Форма I) соединения формулы 1:



### 1

В одном варианте осуществления кристаллогидрат характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой (PXRD), включающей дифракционные пики при значениях  $2\theta$   $5,68\pm 0,20$ ,  $10,43\pm 0,20$ ,  $10,94\pm 0,20$  и  $13,08\pm 0,20$ . Кристаллогидрат дополнительно может характеризоваться PXRD дифрактограммой, имеющей один дополнительный дифракционный пик при значении  $2\theta$   $8,49\pm 0,20$ . Кристаллогидрат дополнительно может характеризоваться PXRD дифрактограммой, имеющей два или более дополнительных дифракционных пика при значениях  $2\theta$ , выбранных из  $11,55\pm 0,20$ ,  $12,20\pm 0,20$ ,  $17,06\pm 0,20$  и  $26,29\pm 0,20$ . Кристаллогидрат дополнительно может характеризоваться PXRD дифрактограммой, имеющей дополнительные дифракционные пики при значениях  $2\theta$   $11,55\pm 0,20$ ,  $12,20\pm 0,20$ ,  $17,06\pm 0,20$  и  $26,29\pm 0,20$ .

Кристаллогидрат может характеризоваться PXRD дифрактограммой, имеющей 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дифракционных пиков при значениях  $2\theta$ , выбранных из  $5,68\pm 0,20$ ,  $8,49\pm 0,20$ ,  $10,43\pm 0,20$ ,  $10,94\pm 0,20$ ,  $11,55\pm 0,20$ ,  $12,20\pm 0,20$ ,  $13,08\pm 0,20$ ,  $15,94\pm 0,20$ ,  $16,24\pm 0,20$ ,  $17,06\pm 0,20$ ,  $17,60\pm 0,20$ ,  $18,41\pm 0,20$ ,  $18,82\pm 0,20$ ,  $18,96\pm 0,20$ ,  $21,90\pm 0,20$ ,  $22,08\pm 0,20$ ,  $22,27\pm 0,20$ ,  $24,55\pm 0,20$  и  $26,29\pm 0,20$ .

Как хорошо известно в области порошковой рентгеновской дифракции, положения пиков PXRD спектров относительно менее чувствительны к экспериментальным деталям, таким как детали получения образца и геометрия инструмента, чем относительная высота пиков. Таким образом, в одном варианте осуществления кристаллогидрат характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, на которой положения пиков по существу соответствуют положениям, показанным на Фиг. 1.

В другом варианте осуществления кристаллогидрат характеризуется своим поведением при воздействии высокой температуры. Как показано на Фиг. 2, кривая дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), записанная при скорости нагревания  $10^\circ\text{C}$  в минуту, демонстрирует эндотерму дегидратации с началом при около  $55,1^\circ\text{C}$  и пик при около  $139,4^\circ\text{C}$ , и пик в эндотермическом тепловом потоке, идентифицированный как переход в расплав с началом при около  $198,6^\circ\text{C}$  и пиком при

около 212,4°C. В одном варианте осуществления форма кристаллогидрата (Форма I) характеризуется кривой дифференциальной сканирующей калориметрии, записанной при скорости нагревания 10°C в минуту, которая показывает максимум в эндотермическом тепловом потоке при температуре 212,4±3°C. В другом варианте осуществления максимум в эндотермическом тепловом потоке соответствует температуре 212,4±2°C. В другом варианте осуществления максимум в эндотермическом тепловом потоке соответствует температуре 212,4±1°C.

В одном варианте осуществления кристаллогидрат представляет собой моногидрат.

Кривая термогравиметрического анализа (TGA) на Фиг. 3 показывает потерю массы примерно на 3,4% при 100,0°C. Соединение дегидратируется при начальной температуре около 27°C. Потерю массы, связанную с разложением, наблюдают при температуре начала разложения около 248,2°C.

Было продемонстрировано, что представленный кристаллогидрат имеет обратимый профиль сорбции/десорбции. Твердое вещество умеренно гигроскопично. Кристаллогидрат продемонстрировал общее поглощение влаги около 5,3%, когда он подвергался условиям относительной влажности в диапазоне от 0% до 90% при комнатной температуре, как показано на Фиг. 4.

Форма I характеризуется элементарной ячейкой, определенной рентгеноструктурным анализом монокристалла, следующих размеров:  $a=20,8736(5) \text{ \AA}$ ;  $b=9,15021(19) \text{ \AA}$ ;  $c=15,7412(3) \text{ \AA}$ ;  $a=90^\circ$ ;  $b=98,4786(18)^\circ$ ; и  $g=90^\circ$ . Монокристалл Формы I, проанализированный при температуре 100(2) К, характеризуется моноклинной кристаллической системой с размерами:  $a=20,8736(5) \text{ \AA}$ ;  $b=9,15021(19) \text{ \AA}$ ;  $c=15,7412(3) \text{ \AA}$ ;  $a=90^\circ$ ;  $b=98,4786(18)^\circ$ ;  $g=90^\circ$ ; объем ячейки ( $V$ )  $2973,67(11) \text{ \AA}^3$  и пространственная группа  $C2$ .

Форма I продемонстрировала хорошую стабильность в условиях повышенных температур и относительной влажности, как показано в Примере 10.

#### Процедуры синтеза

Соединение **1** можно получить из легкодоступных исходных веществ с использованием процедур, описанных в приведенных ниже Примерах, или с использованием процедур, описанных в принадлежащей тому же правообладателю заявке США, указанной в настоящей заявке в разделе Предпосылки создания изобретения.

Форму I можно получить путем:

(a) растворения (S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-c]пиридин-6-ил)метанона в спиртовом растворителе при температуре 55°C ±10°C с получением раствора;

(b) охлаждения раствора, полученного на стадии (a), до 10°C ±10°C с получением суспензии;

(c) выделения твердого вещества из суспензии стадии (b) в условиях инертного газа;

(d) сушки твердого вещества, полученного на стадии (c) при  $60^{\circ}\text{C} \pm 15^{\circ}\text{C}$ ;

(e) выдерживания твердого вещества, полученного на стадии (d), в условиях окружающей влажности и температуры с получением кристаллогидрата.

В некоторых вариантах осуществления спиртовой растворитель представляет собой метанол. В некоторых вариантах осуществления спиртовой растворитель представляет собой этанол.

В некоторых вариантах осуществления затравочные кристаллы Формы I добавляют для инициирования образования суспензии на стадии (b).

#### Фармацевтические композиции

Твердую форму кристаллогидрата по настоящему изобретению можно использовать в форме фармацевтической композиции или состава. Такие фармацевтические композиции можно успешно вводить пациенту путем ингаляции. Кроме того, фармацевтические композиции можно вводить любым приемлемым способом введения, включая, но не ограничиваясь этим, пероральный, местный (включая трансдермальный), ректальный, назальный и парентеральный способы введения.

Соответственно, в одном варианте осуществления в настоящей заявке представлена фармацевтическая композиция, включающая фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент и кристаллогидрат соединения **1** (Форма I). Необязательно такие фармацевтические композиции могут содержать другие терапевтические средства и/или агенты для формулирования композиций, если это необходимо. При обсуждении композиций и их применения кристаллогидрат соединения **1** (Форма I) также может быть указан в настоящей заявке как "активное вещество".

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению обычно содержат терапевтически эффективное количество кристаллогидрата соединения **1** (Форма I). Однако специалистам в данной области техники будет понятно, что фармацевтическая композиция может содержать количество, превышающее терапевтически эффективное, т.е. нерасфасованные композиции, или меньшее, чем терапевтически эффективное количество, т.е. отдельные стандартные дозы, предназначенные для многократного введения для достижения терапевтически эффективного количества.

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

В фармацевтических композициях по настоящему изобретению можно использовать любой обычный носитель или эксципиент. Выбор конкретного носителя или эксципиента или комбинаций носителей или эксципиентов будет зависеть от способа введения, используемого для лечения конкретного пациента, или типа медицинского состояния или болезненного состояния. В этом отношении получение подходящей фармацевтической композиции для конкретного способа введения находится в пределах компетенции специалистов в области фармацевтики. Кроме того, носители или эксципиенты, используемые в фармацевтических композициях по настоящему

изобретению, являются коммерчески доступными. В качестве дополнительной иллюстрации, традиционные способы получения фармацевтических композиций описаны в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000); and H.C. Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999).

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

Фармацевтические композиции обычно получают путем тщательного и тесного смешения или объединения активного вещества с фармацевтически приемлемым носителем и одним или несколькими необязательными ингредиентами. Полученной однородной смеси затем можно придать форму или загрузить ее в таблетки, капсулы, пилюли и т.п. с использованием обычных процедур и оборудования.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция является подходящей для ингаляционного введения. Фармацевтические композиции для ингаляционного введения обычно имеют форму аэрозоля или порошка. Такие композиции обычно вводят при помощи ингаляторных устройств доставки, таких как ингалятор сухого порошка (DPI), дозирующий ингалятор (MDI), ингалятор-распылитель или подобное устройство доставки.

В конкретном варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят путем ингаляции с использованием ингалятора сухого порошка. Такие ингаляторы сухого порошка обычно вводят фармацевтическую композицию в виде свободно текущего порошка, который рассеивается в воздушном потоке пациента во время вдоха. Для получения сыпучей порошковой композиции терапевтическое средство обычно объединяют с подходящим эксципиентом, таким как лактоза, крахмал, маннит, декстроза, полимолочная кислота (PLA), полилактид-со-гликолид (PLGA) или их комбинации. Как правило, терапевтическое средство микронизируют и объединяют с подходящим носителем с образованием композиции, подходящей для ингаляции.

Репрезентативная фармацевтическая композиция для применения в ингаляторе сухого порошка включает лактозу и кристаллогидрат соединения **1** в микронизированной форме. Такая композиция сухого порошка может быть получена, например, путем объединения сухой размолотой лактозы с терапевтическим средством и последующего сухого смешивания компонентов. Затем композицию обычно загружают в дозатор сухого порошка или в ингаляционные картриджи или капсулы для использования с устройством доставки сухого порошка.

Устройства доставки, такие как ингаляторы сухого порошка, подходящие для введения терапевтических средств путем ингаляции, описаны в данной области техники, и примеры таких устройств являются коммерчески доступными. Например, репрезентативные устройства доставки или продукты, представляющие собой ингаляторы сухого порошка, включают Aeolizer (Novartis); Airmax (IVAX); ClickHaler (Innovata Biomed); Diskhaler (GlaxoSmithKline); Diskus/Accuhaler (GlaxoSmithKline); Ellipta (GlaxoSmithKline); Easyhaler (Orion Pharma); Eclipse (Aventis); FlowCaps (Hovione); Handihaler (Boehringer Ingelheim); Pulvinal (Chiesi); Rotahaler (GlaxoSmithKline); SkyeHaler/Certihaler (SkyePharma); Twisthaler (Schering-Plough); Turbuhaler (AstraZeneca); Ultrahaler (Aventis); и подобные.

В другом конкретном варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят путем ингаляции с использованием дозирующего ингалятора. Такие дозирующие ингаляторы обычно высвобождают дозированное количество терапевтического средства с использованием сжатого газа-пропеллента. Соответственно, фармацевтические композиции, вводимые с использованием дозирующего ингалятора, обычно включают суспензии терапевтического средства в сжиженном пропелленте. Можно использовать любой подходящий сжиженный пропеллент, включая гидрофторалканы (HFA), такие как 1,1,1,2-тетрафторэтан (HFA 134a) и 1,1,1,2,3,3,3-гептафтор-н-пропан, (HFA 227); и хлорфторуглероды, такие как CCl<sub>3</sub>F. В конкретном варианте осуществления пропеллент представляет собой гидрофторалкан. В некоторых вариантах осуществления композиция гидрофторалкана содержит соразтворитель, такой как этанол или пентан, и/или поверхностно-активное вещество, такое как триолеат сорбитана, олеиновая кислота, лецитин и глицерин.

Репрезентативная фармацевтическая композиция для использования в дозирующем ингаляторе включает от около 0,01% до около 5% по массе кристаллогидрата соединения **1** (Форма I); от около 0% до около 20% по массе этанола; и от около 0% до около 5% по массе поверхностно-активного вещества; а остальное составляет HFA пропеллент. Такие композиции обычно получают добавлением охлажденного гидрофторалкана или гидрофторалкана под давлением в подходящий контейнер, содержащий терапевтическое средство, этанол (если присутствует) и поверхностно-активное вещество (если присутствует). Для получения суспензии терапевтическое средство микронизируют, а затем смешивают с пропеллентом. Затем композицию загружают в аэрозольный баллончик, который обычно образует часть устройства дозирующего ингалятора.

Дозирующие ингаляторы, подходящие для введения терапевтических средств путем ингаляции, описаны в данной области техники и примеры таких устройств являются коммерчески доступными. Например, репрезентативные устройства или продукты, представляющие собой дозирующие ингаляторы, включают AeroBid Inhaler System (Forest Pharmaceuticals); Atrovent Inhalation Aerosol (Boehringer Ingelheim); Flovent (GlaxoSmithKline); Maxair Inhaler (3M); Proventil Inhaler (Schering); Serevent Inhalation Aerosol (GlaxoSmithKline); и подобные.

В другом конкретном варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят путем ингаляции с использованием ингалятора-распылителя. Такие распылительные устройства обычно создают поток воздуха с высокой скоростью, который заставляет фармацевтическую композицию распыляться в виде тумана, который попадает в дыхательные пути пациента. Соответственно, при формулировании для применения в ингаляторе-распылителе терапевтическое средство может быть микронизировано или измельчено и объединено с подходящим носителем с образованием суспензии.

Репрезентативная фармацевтическая композиция для применения в ингаляторе-распылителе включает суспензию, включающую от около 0,05 мкг/мл до около 20 мг/мл кристаллогидрата по настоящему изобретению, и эксципиенты, совместимые с композициями для распыления. В одном варианте осуществления раствор имеет pH от около 3 до около 8.

Распылительные устройства, подходящие для введения терапевтических средств путем ингаляции, описаны в данной области техники и примеры таких устройств являются коммерчески доступными. Например, репрезентативные распылительные устройства или продукты включают Respimat Softmist Inhaler (Boehringer Ingelheim); AERx Pulmonary Delivery System (Aradigm Corp.); PARI LC Plus Reusable Nebulizer (Pari GmbH); и подобные.

В еще одном варианте осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению альтернативно могут быть получены в дозированной форме, предназначенной для перорального введения. Подходящие фармацевтические композиции для перорального введения могут быть в форме капсул, таблеток, пилюль, пастилок, облаток, драже, порошков, гранул; или в виде суспензии в водной или неводной жидкости; и т.п.; каждая из которых содержит заданное количество кристаллогидрата соединения **1** (Форма I) в качестве активного ингредиента.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, предназначенные для перорального введения в виде твердой лекарственной формы обычно включают активное вещество и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, таких как цитрат натрия или дикальцийфосфат. Необязательно или альтернативно, такие твердые лекарственные формы могут также включать: наполнители или создающие объем вещества, связующие вещества, увлажнители, замедлители растворения, ускорители абсорбции, смачивающие вещества, абсорбенты, смазывающие вещества, красители и

буферные вещества. Агенты высвобождения, смачивающие агенты, покрывающие агенты, подсластители, ароматизаторы и отдушки, консерванты и антиоксиданты также могут присутствовать в фармацевтических композициях по настоящему изобретению.

Форму I также можно сформулировать в виде стерильной водной суспензии для глазных инъекций. Полезные эксципиенты, которые могут быть включены в такую водную композицию, включают полисорбат 80, карбоксиметилцеллюлозу, хлорид калия, хлорид кальция, хлорид магния, ацетат натрия, цитрат натрия, гистидин, дигидрат  $\alpha$ - $\alpha$ -трегалозы, сахарозу, полисорбат 20, гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин и фосфат натрия. Бензиловый спирт может служить консервантом, а хлорид натрия может быть включен для регулирования тоничности. Кроме того, к раствору для регулирования pH можно добавить хлористоводородную кислоту и/или гидроксид натрия. Водные композиции для глазных инъекций могут быть получены без консервантов.

Альтернативные композиции могут также включать композиции с контролируемым высвобождением, трансдермальные пластыри и парентеральные композиции. Обычные эксципиенты и способы получения таких альтернативных композиций описаны, например, в ссылке Remington, *выше*.

Следующие неограничивающие примеры иллюстрируют репрезентативные фармацевтические композиции по настоящему изобретению.

#### *Композиция сухого порошка*

Микронизированный кристаллогидрат соединения **1** (Форма I) (1 г) смешивают с измельченной лактозой (25 г). Затем эту перемешанную смесь загружают в отдельные блистеры отрывной блистерной упаковки в количестве, достаточном для обеспечения от около 0,1 мг до около 4 мг соединения формулы 1 на дозу. Содержимое блистеров вводят с использованием ингалятора сухого порошка.

#### *Композиция сухого порошка*

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

#### *Композиция для дозирующего ингалятора*

Микронизированный кристаллогидрат соединения **1**, Форму I (10 г), диспергируют в растворе, полученном путем растворения лецитина (0,2 г) в деминерализованной воде (200 мл). Полученную суспензию сушат распылением, а затем тонко измельчают с образованием микронизированной композиции, включающей частицы, имеющие средний диаметр меньше чем около 1,5 мкм. Затем микронизированную композицию загружают в картриджи для дозированных ингаляторов, содержащие 1,1,1,2-тетрафторэтан под давлением, в количестве, достаточном для обеспечения от около 0,1 мг до около 4 мг соединения **1** на дозу при введении с использованием дозирующего ингалятора.

#### *Композиция для распылителя*

Кристаллогидрат по настоящему изобретению, Форму I (25 мг), суспендируют в растворе, содержащем 1,5-2,5 эквивалентов хлористоводородной кислоты, с последующим добавлением гидроксида натрия для доведения pH до 3,5-5,5 и 3% по массе глицерина. Суспензию вводят с использованием распылительного устройства, который обеспечивает от около 0,1 мг до около 4 мг соединения **1** на дозу.

#### *Водная композиция для глазных инъекций*

Каждый мл стерильной водной суспензии включает от 5 мг до 50 мг кристаллогидрата соединения **1** (Форма I), хлорид натрия для тоничности, 0,99% (масс/об) бензилового спирта в качестве консерванта, 0,75% натрий карбоксиметилцеллюлозы и 0,04% полисорбата. Гидроксид натрия или хлористоводородная кислота могут быть включены для доведения pH до 5-7,5.

#### *Водная композиция для глазных инъекций*

Стерильная водная суспензия без консервантов включает от 5 мг/мл до 50 мг/мл кристаллогидрата соединения **1** (Форма I) в 10 mM фосфата натрия, 40 mM хлорида натрия, 0,03% полисорбата 20 и 5% сахарозы.

#### Применимость

Соединение **1** было разработано для лечения воспалительных и фиброзных заболеваний дыхательных путей. В частности, это соединение было разработано для обеспечения доставки сильного антицитокинового средства непосредственно к месту действия респираторного заболевания в легких при ограничении системного воздействия.

Было показано, что соединение **1** является сильным ингибитором JAK семейства ферментов: JAK1, JAK2, JAK3 и TYK2. Кроме того, соединение **1** продемонстрировало сильное ингибирование провоспалительных и профибротических цитокинов. Было признано, что широкий противовоспалительный эффект ингибиторов JAK может подавлять нормальную функцию иммунных клеток, потенциально приводя к повышенному риску инфекции. Соединение по настоящему изобретению было оптимизировано для ограничения абсорбции из легких в плазму, таким образом сводя к минимуму риск иммуносупрессии.

Как описано в экспериментальном разделе ниже, абсорбция и распределение соединения **1** были профилированы в доклинических анализах. Соединение **1** было испытано на мышах, и оно показало через 5 часов после введения дозы высокую концентрацию в легочной ткани и низкую абсорбцию в плазме. Было показано, что соединение **1** ингибирует эффект провоспалительных цитокинов IL-13 в легочной ткани мыши. В частности, это соединение продемонстрировало ингибирование IL-13-индуцированного фосфорилирования STAT6 в легочной ткани, что свидетельствует о локальном взаимодействии с JAK мишенью в легких *in vivo*. Этот эффект наблюдали при введении провоспалительного цитокина IL-13 через 4 часа после введения испытываемого соединения, что давало дополнительные доказательства значительного удерживания в легких.

Было продемонстрировано, что соединение **1** проявляет как сильную

ингибирующую активность на клеточном уровне, так и значительное удержание в легочной ткани. Обширное исследование, проведенное авторами настоящего изобретения, показало, что, хотя можно идентифицировать соединения, обладающие активностью на клеточном уровне, или соединения, которые демонстрируют значительное удержание в легких, гораздо труднее обнаружить соединения, которые проявляют обе желаемые характеристики одновременно.

Противовоспалительная активность ингибиторов JAK была убедительно продемонстрирована на доклинических моделях астмы (Malaviya et al., *Int. Immunopharmacol.*, **2010**, 10, 829-836; Matsunaga et al., *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **2011**, 404, 261-267; Kudlacz et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **2008**, 582, 154-161). Цитокины, участвующие в воспалении при астме, которые передают сигнал через путь JAK-STAT, включают IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-13, IL-23, IL-31, IL-27, тимический стромальный лимфопоэтин (TSLP), интерферон- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). Соответственно, ожидается, что соединение **1** и его кристаллогидрат, Форма I, будут полезны для лечения воспалительных респираторных заболеваний, в частности, астмы. Астму классифицируют как Th2-низкий и Th2-высокий подтип (Simpson et al, *Respirology*, **2006**, 11, 54-61). IL-4, IL-13, IL-5 и TSLP вовлечены в Th2-высокий подтип астмы, тогда как IL-23/IL-12, IL-6, IL-27 и IFN $\gamma$  вовлечены в Th2-низкий подтип астмы. Основываясь на своем пан-ингибирующем профиле JAK, соединение **1** сильно ингибирует медиаторы как Th2-высокого, так и Th2-низкого подтипа астмы. Таким образом, ожидается, что форма I соединения **1** будет полезна при лечении как как Th2-высокого, так и Th2-низкого подтипа астмы.

Воспаление и фиброз легких характерны не только для астмы, но и для других респираторных заболеваний, таких как хроническая обструктивная болезнь легких (COPD), кистозный фиброз (CF), пневмонит, интерстициальные заболевания легких (включая идиопатический легочный фиброз), острое поражение легких, острый респираторный дистресс-синдром, бронхит, эмфизема, облитерирующий бронхиолит и саркоидоз. Таким образом, соединение **1** и его кристаллогидрат, Форма I, как ожидают, также будут полезны для лечения хронической обструктивной болезни легких, кистозного фиброза, пневмонита, интерстициальных заболеваний легких (включая идиопатический легочный фиброз), острого поражения легких, острого респираторного дистресс-синдрома, бронхита, эмфиземы, облитерирующего бронхиолита и саркоидоза.

Было показано, что по сравнению с соответствующим фторсодержащим аналогом (соединение **C-1**) соединение **1** обладает аналогичной JAK-активностью. Тем не менее, это имеет то преимущество, что вызывает значительно меньший сульфатационный метаболизм, как показано в разделе Анализы. Это важно, так как в легких происходит сульфатационный метаболизм, что может привести к быстрому снижению воздействия активного исходного соединения.

Соединение **1** продемонстрировало ингибирование цитокинов, связанных с

воспалением. Таким образом, Форма I, вероятно, будет полезна для лечения некоторых специфических респираторных заболеваний, как подробно описано ниже.

Эозинофильное воспаление дыхательных путей является характерным признаком заболеваний, которые в совокупности называются эозинофильными заболеваниями легких (Cottin et al., *Clin. Chest. Med.*, **2016**, 37(3), 535-56). Эозинофильные заболевания связаны с передачей сигналов IL-4, IL-13 и IL-5. Эозинофильные заболевания легких включают инфекции (особенно гельминтозы), лекарственно-индуцированный пневмонит (индуцированный, например терапевтическими препаратами, такими как антибиотики, фенитоин или 1-триптофан), индуцированный грибками пневмонит (например, аллергический бронхолегочный аспергиллез), гиперчувствительный пневмонит и эозинофильный гранулематоз с полиангиитом (ранее известный как синдром Черджа-Стросса). Эозинофильные заболевания легких неизвестной этиологии включают идиопатическую острую эозинофильную пневмонию, идиопатическую хроническую эозинофильную пневмонию, гиперэозинофильный синдром и синдром Леффлера.

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

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

Бронхоэктазы и инфильтративные заболевания легких относятся к заболеваниям, связанным с хроническим нейтрофильным воспалением.

Патологическая активация Т-клеток имеет решающее значение в этиологии множественных респираторных заболеваний. Аутореактивные Т-клетки играют роль в облитерирующем бронхиолите с организующейся пневмонией (также называемом COS). Подобно COS, этиология отторжения легочного трансплантата связана с aberrантной Т-клеточной активацией Т-клеток реципиента трансплантированным донорским легким. Отторжение легочного трансплантата может произойти на ранней стадии как первичная дисфункция трансплантата (PGD), организующаяся пневмония (OP), острое отторжение (AR) или лимфоцитарный бронхиолит (LB), или они могут возникнуть спустя годы после трансплантации легкого как хроническая дисфункция легочного аллотрансплантата (CLAD). CLAD ранее была известна как облитерирующий бронхиолит (BO), но теперь считается синдромом, который может иметь различные патологические проявления, включая BO, рестриктивную CLAD (rCLAD или RAS) и нейтрофильную дисфункцию аллотрансплантата. Хроническая дисфункция легочного аллотрансплантата (CLAD) представляет собой серьезную проблему при длительном лечении реципиентов легочного

трансплантата, поскольку она приводит к постепенной потере функциональности трансплантата легкого (Gauthier et al., *Curr. Transplant. Rep.*, **2016**, 3(3), 185-191). CLAD плохо поддается лечению, поэтому сохраняется потребность в эффективных соединениях, способных предотвращать или лечить это состояние. Некоторые JAK-зависимые цитокины, такие как IFN $\gamma$  и IL-5, активируются при CLAD и отторжении легочного трансплантата (Berastegui et al, *Clin. Transplant.* **2017**, 31, e12898). Более того, высокие уровни хемокинов CXCR3 в легких, таких как CXCL9 и CXCL10, которые находятся на пути ниже JAK-зависимой передачи сигналов IFN, связаны с худшими исходами у пациентов с трансплантацией легких (Shino et al, *PLOS One*, **2017**, 12 (7), e0180281). Было показано, что системное ингибирование JAK эффективно при отторжении почечного трансплантата (Vicenti et al., *American Journal of Transplantation*, **2012**, 12, 2446-56). Следовательно, ингибиторы JAK потенциально могут быть эффективными в предотвращении или замедлении отторжения легочного трансплантата и CLAD. Сходные события активации Т-клеток, описанные в качестве основы для отторжения легочного трансплантата, также считаются основной движущей силой реакции легочного трансплантата против хозяина (GVHD), которая может возникнуть после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Подобно CLAD, легочный GVHD является хроническим прогрессирующим заболеванием с крайне неблагоприятными исходами, и в настоящее время нет одобренных лечений. Ретроспективное многоцентровое обзорное исследование 95 пациентов со стероид-резистентной острой или хронической GVHD, получавших системный ингибитор JAK руксолитиниб в качестве терапии спасения, продемонстрировало полный или частичный ответ на руксолитиниб у большинства пациентов, включая пациентов с легочным GVHD (Zeiser et al, *Leukemia*, **2015**, 29, 10, 2062-68). Поскольку системное ингибирование JAK связано с серьезными побочными эффектами и небольшим терапевтическим индексом, сохраняется потребность в ингаляционном легочном несистемном ингибиторе JAK для предотвращения или замедления отторжения легочного трансплантата или легочного GVHD. Соединение **1** обладает характеристиками, необходимыми для удовлетворения этой потребности. Совсем недавно индуцированный ингибиторами иммунных контрольных точек пневмонит, еще одно заболевание легких, опосредованное Т-клетками, возникло при более широком применении ингибиторов иммунных контрольных точек. У онкологических больных, получавших лечение этими Т-клеточно-стимулирующими средствами, может развиваться фатальный пневмонит.

Анализ реакции смешанных лимфоцитов представляет собой анализ *in-vitro*, который имитирует отторжение трансплантата. Было показано, что соединение **1** эффективно ингибирует секрецию IFN $\gamma$ .

Таким образом, в одном варианте осуществления изобретение обеспечивает способ лечения респираторного заболевания у млекопитающего (например, человека), включающий введение млекопитающему (или человеку) терапевтически эффективного количества кристаллогидрата соединения **1** (Формы I), или фармацевтической

композиции, содержащей кристаллогидрат соединения **1** (Форму I).

В одном варианте осуществления респираторное заболевание выбрано из группы, состоящей из астмы, хронической обструктивной болезни легких, кистозного фиброза, пневмонита, идиопатического легочного фиброза, острого поражения легких, острого респираторного дистресс-синдрома, бронхита, эмфиземы, саркоидоза, эозинофильного заболевания, инфекции легких, гельминтоза, легочной артериальной гипертензии, лимфангиолейомиоматоза, бронхоэктаза, инфильтративного заболевания легких, лекарственно-индуцированного пневмонита, индуцированного грибками пневмонита, аллергического бронхолегочного аспергиллеза, гиперчувствительного пневмонита, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом, идиопатической острой эозинофильной пневмонии, идиопатической хронической эозинофильной пневмонии, гиперэозинофильного синдрома, синдрома Леффлера, облитерирующего бронхиолита с организуемой пневмонией, реакции «легочный трансплантат против хозяина» и пневмонита, индуцированного ингибитором контрольной точки иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления респираторное заболевание представляет собой астму. В некоторых вариантах осуществления астма представляет собой астму от умеренной до тяжелой степени. В некоторых вариантах осуществления астма представляет собой астму от легкой до умеренной степени. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят путем ингаляции. В некоторых вариантах осуществления астма представляет собой астму Th2-высокого подтипа. В некоторых вариантах осуществления астма представляет собой астму Th2-низкого подтипа.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ профилактики или отсрочки отторжения легочного трансплантата у млекопитающего (например, человека), при этом способ включает введение млекопитающему (или человеку) терапевтически эффективного количества кристаллогидрата соединения **1** (Формы I) или фармацевтической композиции, включающей кристаллогидрат соединения **1** (Форму I). В некоторых вариантах осуществления отторжение легочного трансплантата выбрано из группы, состоящей из первичной дисфункции трансплантата, организуемой пневмонии, острого отторжения, лимфоцитарного бронхиолита и хронической дисфункции легочного аллотрансплантата. В некоторых вариантах осуществления отторжение легочного трансплантата представляет собой острое отторжение легочного трансплантата. В некоторых вариантах осуществления отторжение легочного трансплантата представляет собой хроническую дисфункцию легочного аллотрансплантата. В некоторых вариантах осуществления отторжение легочного трансплантата выбрано из группы, состоящей из облитерирующего бронхиолита, рестриктивной хронической дисфункции легочного аллотрансплантата и нейтрофильной дисфункции аллотрансплантата. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят путем ингаляции.

Также в настоящей заявке представлены применения Формы I в медицинском

лечении и для получения композиции или лекарственного средства для лечения, профилактики, отсрочки или облегчения заболеваний, поддающихся лечению ингибитором JAK, в частности респираторных заболеваний и отторжения легочного трансплантата.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения астмы у млекопитающего, при этом способ включает введение млекопитающему терапевтически эффективного количества кристаллогидрата соединения **1** (Формы I) или фармацевтической композиции, включающей фармацевтически приемлемый носитель и кристаллогидрат соединения **1** (Форму I).

При использовании для лечения астмы кристаллогидрат соединения **1** (Формы I) обычно вводят в виде разовой суточной дозы или в виде нескольких доз в день, хотя можно использовать и другие формы введения. Количество активного вещества, вводимого на дозу, или общее количество, вводимое в день, обычно определяется врачом в свете соответствующих обстоятельств, включая состояние, подлежащее лечению, выбранный путь введения, фактическое вводимое соединение и его относительную активность, возраст, массу тела и реакцию конкретного пациента, тяжесть симптомов у пациента и т.п.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения респираторного заболевания (включая, но не ограничиваясь этим, заболевание, описанное в настоящей заявке) у млекопитающего, при этом способ включает введение млекопитающему терапевтически эффективного количества кристаллогидрата соединения **1** (Формы I), или фармацевтической композиции, включающей фармацевтически приемлемый носитель и кристаллогидрат соединения **1** (Форму I).

При использовании для лечения респираторного заболевания (включая, но не ограничиваясь этим, заболевание, описанное в настоящей заявке), кристаллогидрат соединения **1** (Форму I) обычно вводят в виде разовой суточной дозы или в виде нескольких доз в день, хотя можно использовать и другие формы введения. Количество активного вещества, вводимого на дозу, или общее количество, вводимое в день, обычно определяется врачом в свете соответствующих обстоятельств, включая состояние, подлежащее лечению, выбранный путь введения, фактическое вводимое соединение и его относительную активность, возраст, массу тела и реакцию конкретного пациента, тяжесть симптомов у пациента и т.п.

Коронавирус человека является распространенным респираторным патогеном и обычно вызывает легкое заболевание верхних дыхательных путей. Два высокопатогенных вируса, коронавирус, ассоциированный с тяжелым острым респираторным синдромом (SARS-CoV-1), и коронавирус, ассоциированный с ближневосточным респираторным синдромом (MERS-CoV), вызывали тяжелые респираторные синдромы, приводящие к более чем 10% и 35% смертности соответственно (Assiri et al., N Engl J Med., **2013**, 369, 407-1). Недавнее появление коронавирусного заболевания 2019 года (COVID-19 и последующая пандемия) привели к глобальной чрезвычайной ситуации в области

здравоохранения. Подобно SARS-CoV-1 и MERS-CoV, у части пациентов (около 16%) может развиваться тяжелое респираторное заболевание, проявляющееся острым поражением легких (ALI), которое приводит к госпитализации в отделение интенсивной терапии (ICU) (около 5%), дыхательной недостаточности (около 6,1%) и смерти (Wang et al., JAMA, **2020**, 323, 11, 1061-1069; Guan et al., N Engl J Med., **2020**, 382, 1708-1720; Huang et al., The Lancet, **2020**, 395 (10223), 497-506; Chen et al., The Lancet, **2020**, 395(10223), 507-13). У подгруппы пациентов с COVID-19, по-видимому, наблюдается гипервоспалительный “цитокиновый шторм”, приводящий к острому поражению легких и острому респираторному дистресс-синдрому (ARDS). Этот цитокиновый шторм может также распространиться на системный кровоток и вызвать сепсис и, в конечном счете, синдром полиорганной дисфункции. Нарушение регуляции передачи сигналов цитокинов, проявляющееся при COVID-19, характеризуется повышенной экспрессией интерферонов (IFN), интерлейкинов (IL) и хемокинов, что приводит к ALI и связанной с ним смертности. Этот гипервоспалительный ответ потенциально можно модулировать и лечить при помощи легочно-селективного ингибитора pan-Janus киназы (JAK). Моноклональные антитела, направленные против IL-6 (тоцилизумаб и сарилумаб), по-видимому, эффективны при лечении пациентов с ALI, вызванным COVID-19 (Xu X, Han M, Li T, Sun W, Wang D, Fu B, et al. Effective Treatment of Severe COVID-19 Patients with Tocilizumab, **2020**, PNAS, <https://doi.org/10.1073/pnas.2005615117>). Хотя модели COVID-19 in vivo еще не опубликованы, заражение адаптированными для мышей штаммами 2003 SARS-CoV-1 и 2012 MERS-CoV, а также трансгенная мышь, экспрессирующая рецептор hACE2 SARS-CoV-1 человека, инфицированная SARS-CoV-1 человека, демонстрируют повышение уровня JAK-зависимых цитокинов, таких как IFN $\gamma$ , IL-6 и IL-12, и находящихся на пути ниже хемокинов, таких как хемокиновый (C-C мотив) лиганд 10 (CCL10), CCL2 и CCL7 (McCray et al., J Virol., **2007**, 81(2), 813-21; Gretebeck et al., Curr Opin Virol. **2015**, 13, 123-9.; Day et al., Virology. **2009**, 395(2), 210-22. Также было показано, что ингибиторы JAK полезны на мышинных моделях ALI, индуцированного липополисахаридом или ганцикловиром (Severgnini et al., Am J Respir Crit Care Med., **2005**, 171(8), 858-67; Jin et al., Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol., **2018**, 314(5), L882-92). Наконец, на основании результатов клинических испытаний барицитиниб, ингибитор JAK, получил разрешение на экстренное применение (EUA) в сочетании с ремдесивиром для лечения COVID-19 у пациентов, которым требуется дополнительный кислород, инвазивная механическая вентиляция легких или экстракорпоральная мембранная оксигенация (<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-drug-combination-treatment-covid-19#:~:text=Today%2C%20the%20U.S.%20Food%20and,or%20older%20requiring%20supplemental%20oxygen%2C>). В клиническом исследовании госпитализированных пациентов с COVID-19 было показано, что барицитиниб в сочетании с ремдесивиром сокращает время до выздоровления до 29 дней после начала лечения по сравнению с пациентами, которые получали плацебо с ремдесивиром.

Таким образом, соединение **1**, которое представляет собой селективный для легких ингаляционный ингибитор pan-JAK, может быть уникально подходящим для ослабления цитокинового шторма, связанного с COVID-19. Доставляя в легкие и избегая системной иммуносупрессии, также можно избежать дополнительных инфекций, которые приводят к ухудшению смертности. Это особенно верно для тех пациентов, которым требуется искусственная вентиляция легких. Поскольку основными причинами смерти у пациентов с COVID-19, по-видимому, являются сопутствующие заболевания и суперинфекция, ингаляционное лекарственное средство может представлять собой путь, избегающий системной иммуносупрессии, которая предрасполагает пациентов к этим рискам.

Таким образом, в настоящем изобретении предложен способ лечения млекопитающего (или пациента), инфицированного коронавирусом, таким как SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 и MERS-CoV, или имеющего его симптомы, при этом способ включает введение млекопитающему (или пациенту) кристаллогидрата соединения **1** (Формы I) по настоящему изобретению или фармацевтической композиции, включающей фармацевтически приемлемый носитель и кристаллогидрат соединения **1** (Форму I) по настоящему изобретению. Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения ALI и/или ARDS у млекопитающего (или пациента), вызванного коронавирусной инфекцией (такой как SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 и MERS-CoV), при этом способ включает введение млекопитающему (или пациенту) кристаллогидрата соединения **1** (Формы I) по настоящему изобретению или фармацевтической композиции, включающей фармацевтически приемлемый носитель и кристаллогидрат соединения **1** (Форму I) по настоящему изобретению.

Механизм действия ингибиторов JAK связан с лечением воспалительных заболеваний носа (Therapeutic Effects of Intranasal Tofacitinib on Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps in Mice, Joo et al., *The Laryngoscope*, **2020**, <https://doi.org/10.1002/lary.29129>). Кроме того, Дупилумаб, действие которого направлено на блокирование сигнальных путей IL-4 и IL-13, был одобрен для лечения хронического риносинусита с полипами носа.

Таким образом, также в настоящей заявке представлен способ лечения воспалительных заболеваний носа у млекопитающего (например, человека), при этом способ включает введение млекопитающему (или человеку) кристаллогидрата соединения **1** (Формы I) по настоящему изобретению или фармацевтической композиции, включающей фармацевтически приемлемый носитель и кристаллогидрат соединения **1** (Форму I) по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание носа выбрано из группы, состоящей из хронического риносинусита с полипами носа или без них, назального полипоза, синусита с полипами носа и ринита (неаллергического, аллергического, круглогодичного и вазомоторного ринита).

В качестве ингибитора JAK кристаллогидрат соединения **1** (формы I) по настоящему изобретению также может быть полезен при ряде других заболеваний.

Кристаллогидрат соединения **1** (Формы I) по настоящему изобретению может быть полезен при различных показаниях, связанных с воспалением желудочно-кишечного тракта, которые включают, но не ограничиваются этим, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит (проктосигмоидит, панколит, язвенный проктит и левосторонний колит), болезнь Крона, коллагенозный колит, лимфоцитарный колит, болезнь Бехчета, глютеновую болезнь; колит, индуцированный ингибитором иммунных контрольных точек, илеит, эозинофильный эзофагит; колит, связанный с болезнью «трансплантат против хозяина», и инфекционный колит. Язвенный колит (Reimund et al., *J. Clin. Immunology*, **1996**, 16, 144-150), болезнь Крона (Woywodt et al., *Eur. J. Gastroenterology Hepatology*, **1999**, 11, 267-276), 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 болезнью «трансплантат против хозяина» (Coghill et al., *Blood*, **2001**, 117, 3268-3276), инфекционный колит (Stallmach et al., *Int. J. Colorectal Dis.*, **2004**, 19, 308-315), болезнь Бехчета (Zhou et al., *Autoimmun. Rev.*, **2012**, 11, 699-704), глютеновая болезнь (de Nitto et al., *World J. Gastroenterol.*, **2009**, 15, 4609-4614), колит, индуцированный ингибитором 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 уровней определенных провоспалительных цитокинов. Поскольку многие провоспалительные цитокины осуществляют передачу сигналов через активацию JAK, соединения, описанные в настоящей заявке, могут ослаблять воспаление и обеспечивать облегчение симптомов. В частности, кристаллогидрат соединения **1** (Форма I) по настоящему изобретению может быть полезен для индукции и поддержания ремиссии язвенного колита, а также для лечения болезни Крона, колита, индуцированного ингибитором иммунных контрольных точек, и побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта при заболевании «трансплантат против хозяина». Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения воспалительного заболевания желудочно-кишечного тракта у млекопитающего (например, человека), при этом способ включает введение млекопитающему кристаллогидрата соединения **1** (Формы I) по настоящему изобретению или фармацевтической композиции, включающей фармацевтически приемлемый носитель и кристаллогидрат соединения **1** (Форму I).

Атопический дерматит и другие воспалительные заболевания кожи связаны с повышением уровня провоспалительных цитокинов, которые зависят от пути JAK-STAT. Следовательно, кристаллогидрат соединения **1** (Форма I) по настоящему изобретению может быть полезен при ряде кожных воспалительных или вызывающих зуд состояний, которые включают, но не ограничиваются этим, атопический дерматит, очаговую алопецию, витилиго, псориаз, дерматомиозит, кожную Т-клеточную лимфому (Netchiporouk et al., *Cell Cycle* **2014**; 13, 3331-3335) и подтипы (синдром Сезари,

фунгоидный микоз, педжетоидный ретикулез, гранулематозная дряблая кожа, лимфоматоидный папулез, хронический лихеноидный пситириаз, острый лихеноидный вариолиформный пситириаз, CD30+ кожная Т-клеточная лимфома, вторичная кожная CD30+ крупноклеточная лимфома, не связанная с фунгоидным микозом CD30- кожная крупноклеточная Т-клеточная лимфома, плеоморфная Т-клеточная лимфома, лимфома Леннерта, подкожная Т-клеточная лимфома, ангиоцентрическая лимфома, бластная НК-клеточная лимфома), узелковую почесуху, красный плоский лишай, первичный локализованный кожный амилоидоз, буллезный пемфигоид, кожные проявления реакции «трансплантат против хозяина», пемфигоид, дискоидную волчанку, кольцевидную гранулему, простой хронический лишай, вульварный/мошоночный/периаанальный зуд, склероатрофический лишай, зуд после герпетической невралгии, плоский волосяной лишай и декальвирующий фолликулит. В частности, атопический дерматит (Bao et al., JAK-STAT, **2013**, 2, e24137), очаговая алопеция (Xing et al., Nat. Med. **2014**, 20, 1043-1049), витилиго (Craiglow et al., JAMA Dermatol. **2015**, 151, 1110-1112), узелковая почесуха (Sunkoly et al., J. Allergy Clin. Immunol. **2006**, 117, 411-417), красный плоский лишай (Welz-Kubiak et al., J. Immunol. Res. **2015**, ID:854747), первичный локализованный кожный амилоидоз (Tanaka et al., Br. J. Dermatol. **2009**, 161, 1217-1224), буллезный пемфигоид (Feliciani et al., Int. J. Immunopathol. Pharmacol. **1999**, 12, 55-61) и кожные проявления реакции «трансплантат против хозяина» (Okiyama et al., J. Invest. Dermatol. **2014**, 134, 992-1000) характеризуются повышением уровней определенных цитокинов, которые осуществляют передачу сигналов через активацию JAK. Соответственно, кристаллогидрат соединения **1** (Форма I) по настоящему изобретению, может облегчать связанное с этим кожное воспаление или зуд, вызываемые этими цитокинами. В частности, можно ожидать, что кристаллогидрат соединения **1** (Форма I) по настоящему изобретению будет полезен для лечения атопического дерматита и других воспалительных заболеваний кожи. Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения воспалительного заболевания кожи у млекопитающего (например, человека), при этом способ включает нанесение фармацевтической композиции, включающей кристаллогидрат соединения **1** (Форму I) по настоящему изобретению и фармацевтический носитель, на кожу млекопитающего. В одном варианте осуществления воспалительное заболевание кожи представляет собой атопический дерматит.

Было показано, что многие глазные заболевания связаны с повышением уровня провоспалительных цитокинов, которые зависят от пути JAK-STAT. Следовательно, кристаллогидрат соединения **1** (Форма I) может быть полезен для лечения ряда глазных заболеваний, которые включают, но не ограничиваются этим, увеит, диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, синдром сухого глаза, возрастную дегенерацию желтого пятна и атопический кератоконъюнктивит. В частности, увеит (Horai and Caspi, J. Interferon Cytokine Res., **2011**, 31, 733-744), диабетическая ретинопатия (Abcouwer, J. Clin. Cell. Immunol., **2013**, Suppl 1, 1-12), диабетический макулярный отек (Sohn et al., American Journal of Ophthalmology, **2011**, 152, 686-694), синдром сухого глаза

(Stevenson et al, Arch. Ophthalmol., **2012**, 130, 90-100) и возрастная дегенерация желтого пятна (Knickerbein et al, Int. Ophthalmol. Clin., **2015**, 55(3), 63-78) характеризуются повышением уровней определенных провоспалительных цитокинов, которые передают сигналы через путь JAK-STAT. Окклюзия вены сетчатки (RVO) является широко распространенным заболеванием, приводящим к инвалидности по зрению. Обструкция кровотока в сетчатке может привести к повреждению сосудов сетчатки, кровоизлияниям и ишемии тканей. Хотя причины RVO многофакторны, было показано, что важны как сосудистые, так и воспалительные медиаторы (Deobhakta et al, International Journal of Inflammation, **2013**, article ID 438412). Цитокины, которые передают сигналы через путь JAK-STAT, такие как IL-6 и IL-13, а также другие цитокины, такие как MCP-1, продуцирование которых частично обусловлено передачей сигналов через путь JAK-STAT, были обнаружены при повышенных уровнях в тканях глаза пациентов с RVO (Shchuko et al, Indian Journal of Ophthalmology, **2015**, 63(12), 905-911). Соответственно, кристаллогидрат соединения **1** (Форма I) по настоящему изобретению может облегчать сопутствующее воспаление глаз и способствовать регрессии прогрессирования заболевания или обеспечить облегчение симптомов при этом заболевании. Хотя многих пациентов с RVO лечат фотокоагуляцией, это по своей сути деструктивная терапия. Также используют анти-VEGF средства, но они эффективны только у части пациентов. Стероидные препараты, снижающие уровень воспаления в глазу (триамцинолона ацетонид и имплантаты дексаметазона), также показали положительные результаты у пациентов с определенными формами RVO, но также было показано, что они вызывают катаракту и повышение внутриглазного давления/глаукому.

Соответственно, кристаллогидрат соединения **1** (Форма I) по настоящему изобретению может облегчать соответствующее глазное воспаление и способствовать регрессии прогрессирования заболевания или может обеспечить облегчение симптомов. Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения глазного заболевания у млекопитающего, при этом способ включает введение фармацевтической композиции, включающей кристаллогидрат соединения **1** (Форму I) по настоящему изобретению и фармацевтический носитель, в глаз млекопитающего. В одном варианте осуществления глазное заболевание представляет собой увеит, диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, синдром сухого глаза, возрастную дегенерацию желтого пятна, окклюзию вены сетчатки или атопический кератоконъюнктивит. В одном варианте осуществления способ включает введение кристаллогидрата соединения **1** (Формы I) по настоящему изобретению путем интравитреальной инъекции. Кристаллогидрат соединения **1** (Форму I) также можно использовать в комбинации с одним или несколькими соединениями, полезными для глазных заболеваний.

Кристаллогидрат соединения **1** (Форма I) также может быть полезен для лечения других заболеваний, таких как другие воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания или рак. Кристаллогидрат соединения **1** (Форма I) по настоящему

изобретению может быть полезен для лечения одного или нескольких из следующих заболеваний: артрит, ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, отторжение трансплантата, ксерофтальмия, псориазический артрит, диабет, инсулинозависимый диабет, болезнь двигательных нейронов, миелодиспластический синдром, боль, саркопения, кахексия, септический шок, системная красная волчанка, лейкоз, хронический лимфолейкоз, хронический миелоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, острый миелогенный лейкоз, анкилозирующий спондилит, миелофиброз, В-клеточная лимфома, гепатоцеллюлярная карцинома, болезнь Ходжкина, рак молочной железы, множественная миелома, меланома, неходжкинская лимфома, немелкоклеточный рак легкого, светлоклеточная карцинома яичников, опухоль яичника, опухоль поджелудочной железы, истинная полицитемия, синдром Шегрена, саркома мягких тканей, саркома, спленомегалия, Т-клеточная лимфома и большая талассемия.

#### Комбинированная терапия

Кристаллогидрат соединения **1** (Форма I) по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с одним или несколькими средствами, которые действуют по одному и тому же механизму или по разным механизмам для лечения заболевания. Различные средства можно вводить последовательно или одновременно, в виде отдельных композиций или в одной и той же композиции. Полезные классы средств для комбинированной терапии включают, но не ограничиваются этим, агонист бета-2-адренорецептора, антагонист мускариновых рецепторов, агонист глюкокортикоидов; антагонист рецепторов-44, связанных с G-белком; антагонист лейкотриена D4, антагонист мускариновых рецепторов M3, антагонист гистаминовых H1-рецепторов, антагонист иммуноглобулина E, ингибитор PDE 4, антагонист IL-4, антагонист мускариновых рецепторов M1, антагонист гистаминовых рецепторов, антагонист IL-13, антагонист IL-5, ингибитор 5-липоксигеназы, агонист бета-адренорецепторов, антагонист хемокинов CCR3, стимулятор CFTR, модулятор иммуноглобулина, ингибитор лиганда интерлейкина 33, ингибитор PDE 3, ингибитор фосфоинозитид-3 киназы дельта, антагонист тромбксана A2, ингибитор эластазы, ингибитор тирозинкиназы Kit, антагонист лейкотриена E4, антагонист лейкотриена, антагонист PGD2, ингибитор лиганда TNF-альфа, TNF-связывающий агент, ингибитор каскада комплемента, ингибитор лиганда эотаксина, ингибитор глутатионредуктазы, антагонист гистаминовых H4 рецепторов, антагонист IL-6, стимулятор гена IL2, модулятор Fc-рецептора IIВ иммуноглобулина гамма, лиганд интерферона гамма, ингибитор лиганда интерлейкина 13, ингибитор лиганда интерлейкина 17, антагонист L-селектина, ингибитор эластазы лейкоцитов, антагонист лейкотриена C4, ингибитор лейкотриен-С4-синтазы, ингибитор мембранной аминоксидазы меди, ингибитор металлопротеазы-12, ингибитор металлопротеазы-9, модулятор клещевого аллергена, модулятор мускариновых рецепторов, агонист никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, ингибитор ядерного фактора каппа В, антагонист р-селектина, ингибитор PDE 5, антагонист рецепторов PDGF, ингибитор гамма-фосфоинозитид-3-киназы, агонист TLR-7, антагонист TNF, ингибитор

тирозинкиназы Abl, антагонист ацетилхолиновых рецепторов, ингибитор кислой хитиназы млекопитающих, агонист рецепторов АСТН, модулятор полимеризации актина, антагонист аденозиновых A1 рецепторов, стимулятор аденилатциклазы, антагонист адренорецепторов, лиганд адреноркортicotропного гормона, ингибитор алкогольдегидрогеназы 5, стимулятор альфа-1-антитрипсина, ингибитор альфа-1-протеиназы, модулятор андрогеновых рецепторов, стимулятор ангиотензинпревращающего фермента 2, агонист ANP, ингибитор белка Vsr, антагонист бета-1-адренорецепторов, антагонист бета-2-адренорецепторов, модулятор бета-2-адренорецепторов, модулятор бета-амилоида, ингибитор гена BMP10, ингибитор гена BMP15, ингибитор кальциевых каналов, ингибитор катепсина G, ингибитор гена CCL26, модулятор хемокина CCR3, антагонист хемокина CCR4, ингибитор молекулы клеточной адгезии, стимулятор шаперонина, ингибитор хитиназы, антагонист коллагена I, ингибитор комплемента C3, антагонист CSF-1, антагонист хемокина CXCR2, модулятор общей бета-цепи цитокиновых рецепторов, стимулятор цитотоксического Т-лимфоцитарного белка-4, стимулятор дезоксирибонуклеазы I, стимулятор дезоксирибонуклеазы, ингибитор дипептидилпептидазы I, ингибитор ДНК-гиразы, модулятор простаноидных рецепторов DP, антагонист E-селектина, ингибитор тирозинкиназных рецепторов семейства EGFR, модулятор эластина, антагонист эндотелина ET-A, антагонист эндотелина ET-B, ингибитор эпоксидгидролазы, антагонист рецепторов FGF3, ингибитор тирозинкиназы Fyn, ингибитор фактора транскрипции GATA 3, модулятор глюкозилцерамидазы, модулятор рецепторов глутамата, ингибитор лиганда GM-CSF, стимулятор гуанилатциклазы, ингибитор H<sup>+</sup> K<sup>+</sup> АТФазы, модулятор гемоглобина, агонист гепарина, ингибитор гистондеацетилазы, стимулятор гистондеацетилазы-2, ингибитор HMG CoA редуктазы, ингибитор I-каппа В-киназы бета, ингибитор гена ICAM1, антагонист IL-17, модулятор рецепторов IL-17, антагонист IL-23, модулятор рецепторов IL-4, модулятор иммуноглобулина G, агонист иммуноглобулина G1, модулятор иммуноглобулина G1, антагонист IA Fc-рецепторов иммуноглобулина эпсилон, антагонист IIb Fc-рецепторов иммуноглобулина гамма, модулятор иммуноглобулина каппа, сенсбилизатор инсулина, лиганд интерферона бета, антагонист интерлейкин 1-подобных рецепторов, ингибитор лиганда интерлейкина 18, антагонист рецепторов интерлейкина 17A, ингибитор лиганда интерлейкина-1 бета, ингибитор лиганда интерлейкина-5, ингибитор лиганда интерлейкина-6, ингибитор потенциалзависимого калиевого канала-3 KCNA, ингибитор лиганда Kit, агонист ламинина-5, антагонист рецепторов лейкотриена CysLT1, антагонист рецепторов лейкотриена CysLT2, ингибитор гена LOXL2, ингибитор тирозинкиназы Lyn, ингибитор белка MARCKS, ингибитор ассоциированного с MDR белка 4, модулятор металлопротеазы-2, модулятор металлопротеазы-9, антагонист минералокортикоидных рецепторов, антагонист мускариновых рецепторов M2, антагонист мускариновых рецепторов M4, антагонист мускариновых рецепторов M5, агонист рецепторов натрийуретического пептида A, модулятор рецепторов природных киллерных клеток, стимулятор альфа-7-субъединицы никотинового рецептора ACh, модулятор рецепторов

НК-клеток, модулятор ядерного фактора каппа В, агонист рецепторов опиоидного фактора роста, ингибитор Р-гликопротеина, антагонист пуринорецепторов P2X3, ингибитор киназы p38 MAP, модулятор пептидазы 1, ингибитор фосфолипазы A2, ингибитор фосфолипазы C, ингибитор ингибитора-1 активатора плазминогена, антагонист рецепторов фактора активации тромбоцитов, агонист PPAR гамма, агонист простаглицина, ингибитор протеинтирозинкиназы, стимулятор инозитолфосфатазы 1 домена SH2, ингибитор сигнальной трансдукции, ингибитор натриевых каналов, модулятор STAT-3, ингибитор антигена-1 стволовых клеток, модулятор супероксиддисмутазы, ингибитор гликопротеина CD28 поверхности Т-клеток, ингибитор гликопротеина CD8 поверхности Т-клеток, агонист TGF бета, антагонист TGF бета, ингибитор тромбосансинтетазы, ингибитор лиганда стромального лимфопротеина тимуса, агонист тимозина, лиганд тимозина бета 4, агонист TLR-8, агонист TLR-9, стимулятор гена TLR9, ингибитор топоизомеразы IV, стимулятор быстрого скелетного тропонина I, стимулятор быстрого скелетного тропонина T, антагонист рецептора IL-1 типа I, модулятор рецептора TNF типа II, модулятор ионных каналов, стимулятор утероглобина и агонист VIP.

Конкретные средства, которые можно использовать в комбинации с кристаллогидратом соединения **1** (Формы I) по настоящему изобретению включают, но не ограничиваются этим, розиптора ацетат, умеклидиния бромид, секукинумаб, метенкефалина ацетат, тридекактида ацетат, флутиказона пропионат, альфа-циклодекстрин-стабилизированный сульфорафан, тезепелумаб, мометазона фуруат, BI-1467335, дупилумаб, аклидиний, формотерол, AZD-1419, NI-1640V, ривипансел, CMP-001, маннит, ANB-020, омализумаб, трегализумаб, митизакс, бенрализумаб, голимумаб, рофлумиласт, иматиниб, REGN-3500, маситиниб, апремиласт, RPL-554, Актиммун, адалимумаб, рупатадин, парогрелил, МК-1029, беклометазона дипропионат, формотерола fumarat, могамулизумаб, сератродаст, UCB-4144, немиралисиб, СК-2127107, февипипрант, данириксин, бозентан, абатацепт, ЕС-18, дювелисиб, доципарстат, ципрофлоксацин, сальбутамол HFA, эрдостеин, PrEP-001, недокромил, CDX-0158, сальбутамол, энобосарм, R-TPR-022, лензилумаб, флутиказона фуруат, вилантерола трифенатат, флутиказона пропионат, салметерол, PT-007, PRS-060, реместемцел-L, цитруллин, RPC-4046, оксид азота, DS-102, герилимумаб, Актаир, флутиказона фуруат, умеклидиний, вилантерол, AG-NPP709, Гамунекс, инфликсимаб, Ампион, акумапимод, канакинумаб, INS-1007, CYP-001, сирукумаб, флутиказона пропионат, меполизумаб, питавастатин, солитромицин, этанерцепт, ивакафтор, анакинра, MPC-300-IV, гликопиррония бромид, аклидиния бромид, FP-025, рисанкизумаб, гликопирроний, формотерола fumarat, Адипоцелл, YPL-001, тиотропия бромид, гликопиррония бромид, индакатерола малеат, андекаликсимаб, олодатерол, эзомепразол, вакцину против пылевого клеща, вакцину против аллергена пыльцы полыни, ваморолон, гефапиксант, ревефенацин, гефитиниб, ReJoin, типелукаст, бедорадрин, SCM-CGH, SHP-652, RNS-60, бродалумаб, BIO-11006, умеклидиния бромид, вилантерола трифенатат, ипратропия

бромид, тралокинумаб, PUR-1800, VX-561, VX-371, олопатадин, тулобутерол, формотерола fumarat, триамцинолона ацетонид, реслизумаб, салметерола ксинафоат, флутиказона пропионат, беклометазона дипропионат, формотерола fumarat, тиотропия бромид, лигелизумаб, RUTI, бертилимумаб, омализумаб, гликопиррония бромид, SENS-111, беклометазона дипропионат, CHF-5992, LT-4001, индакатерол, гликопиррония бромид, мометазона фууроат, фексофенадин, гликопиррония бромид, азитромицин, AZD-7594, формотерол, CHF-6001, батифентерол, OATD-01, олодатерол, CJM-112, розиглитазон, салметерол, сетитипрант, ингаляционный интерферон бета, AZD-8871, плеканатид, флутиказон, салметерол, моноглицериды эйкозапентаеновой кислоты, лебрикизумаб, RG-6149, QBKPN, Мометазон, индакатерол, AZD-9898, пируват натрия, зилеутон, CG-201, имидафенацин, CNTO-6785, CLBS-03, мометазон, RGN-137, прокатерол, формотерол, CCI-15106, POL-6014, индакатерол, беклометазон, MV-130, GC-1112, Аллерговак депо, MEDI-3506, QBW-251, ZPL-389, уденафил, GSK-3772847, левоцетиризин, AXP-1275, ADC-3680, тимапирант, абедитерол, AZD-7594, ипратропия бромид, сальбутамола сульфат, тадекиниг альфа, ACT-774312, дорназа альфа, илопрост, батифентерол, флутиказона фууроат, аликафорсен, циклесонид, эмераид, арформотерол, SB-010, Озагрел, BTT-1023, Дектрекумаб, левальбутерол, пранлукаст, гиалуриновая кислота, GSK-2292767, Формотерол, NOV-14, Луцинактант, сальбутамол, преднизолон, эбастин, дексаметазона ципецилат, GSK-2586881, BI-443651, GSK-2256294, VR-179, VR-096, hdm-ASIT+, будесонид, GSK-2245035, VTX-1463, Эмедастин, декспрамипексол, левальбутерол, N-6022, дексаметазона натрия фосфат, PIN-201104, ОРК-0018, TEV-48107, суплатаст, BI-1060469, Гемилукаст, гамма-интерферон, далазатид, биластин, флутиказона пропионат, салметерола ксинафоат, RP-3128, бенциклоквициум бромид, реслизумаб, PBF-680, антагонист CRTN2, Пранлукаст, салметерола ксинафоат, флутиказона пропионат, тиотропия бромида моногидрат, мазилукаст, RG-7990, Доксофиллин, абедитерол, гликопиррония бромид, TEV-46017, ASM-024, флутиказона пропионат, гликопиррония бромид, салметерола ксинафоат, сальбутамол, TA-270, Флунизолит, хромогликат натрия, Epsi-gam, ZPL-521, сальбутамол, авиптадил, TRN-157, Зафирлукаст, Стемпеуцел, пемироласт натрия, надолол, флутиказона пропионат+салметерола ксинафоат, RV-1729, сальбутамола сульфат, диоксид углерода+перфтороктилбромид, APL-1, дектрекумаб+VAK-694, ацетилсалицилат лизина, зилеутон, TR-4, аллогенную терапию мезенхимальными клетками-предшественниками жировой ткани человека, MEDI-9314, PL-3994, HMP-301, TD-5471, NKTT-120, пемироласт, беклометазона дипропионат, транинтерол, моносодиум альфа-люминол, IMD-1041, AM-211, TBS-5, ARRY-502, сератродаст, рекомбинантную мидизмазу, ASM-8, дефлазакорт, бамбутерол, RBx-10017609, ипратропий+фенотерол, флутиказон+формотерол, эпинастин, WIN-901X, VALERGEN-DS, OligoG-COPD-5/20, тулобутерол, оксис Турбухалер, DSP-3025, ASM-024, мизоластин, будесонид+салметерол, LH-011, AXP-E, гистамин+иммуноглобулин человека, YHD-001, теофиллин, амброксол+эрдостеин, раматробан, монтелукаст, пранлукаст, AG-1321001, тулобутерол, ипратропий+сальбутамол, траниласт,

метилпреднизолона сулептанат, колфорсин даропат, репиринат и доксифиллин.

Также в настоящей заявке представлена фармацевтическая композиция, включающая кристаллогидрат соединения **1** (Форму I) по настоящему изобретению и одно или несколько других терапевтических средств. Терапевтическое средство может быть выбрано из класса средств, перечисленных выше, и из перечня конкретных средств, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является подходящей для доставки в легкие. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является подходящей для ингаляционного введения или введения через небулайзер. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой сухой порошок или жидкую суспензию.

Кроме того, в способе осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения заболевания или расстройства у млекопитающего, включающий введение млекопитающему кристаллогидрата соединения **1** (Формы I) по настоящему изобретению и одного или нескольких других терапевтических средств.

При использовании в комбинированной терапии терапевтические средства могут быть включены в одну фармацевтическую композицию, или они могут быть представлены в виде отдельных композиций, которые вводят одновременно или в разное время, одним и тем же или разными путями введения. Такие композиции могут быть упакованы отдельно или могут быть упакованы вместе в виде набора. Два или более терапевтических средства в наборе можно вводить одним и тем же путем введения или разными путями введения.

#### ПРИМЕРЫ

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

ACN =	ацетонитрил
Calcd =	рассчитано
DCM =	дихлорметан
DIPEA =	N, N-диизопропилэтиламин
DMF =	N, N-диметилформамид
EtOAc =	этилацетат
ч =	час(ы)
HATU =	N,N,N',N'-тетраметил-O-(7-азабензотриазол-1-ил)урония гексафторфосфат
IPA =	изопропиловый спирт
IPAc =	изопропилацетат
KOAc =	ацетат калия

MeOH =	метанол
мин =	минута(минуты)
PdCl <sub>2</sub> (dppf) =	дихлор(1,1'-бис(дифенилфосфино)-ферроцен) дипалладий (II)
Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> =	тетракис(трифенилфосфин)палладий(0)
Комн. темп. =	комнатная температура
TEA =	триэтиламин
TFA =	трифторуксусная кислота
THF =	тетрагидрофуран
бис(пинаколато)дибор =	4,4,5,5,4',4',5',5'-октаметил- [2,2']би[[1,3,2]диоксабороланил]

Реагенты и растворители приобретались у коммерческих поставщиков (Aldrich, Fluka, Sigma и др.) и использовались без дополнительной очистки. Ход реакций контролировали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ), аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (анал. ВЭЖХ) и масс-спектрометрии. Реакционные смеси обрабатывали, как описано конкретно для каждой реакции; обычно их очищали экстракцией и другими методами очистки, такими как кристаллизация в зависимости от температуры и растворителя и осаждение. Кроме того, реакционные смеси обычно очищали колоночной хроматографии или препаративной ВЭЖХ, обычно с использованием колоночных насадок C18 или BDS и обычных элюентов. Типичные условия препаративной ВЭЖХ описаны ниже.

Характеристику продуктов реакции обычно осуществляли методом 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 спектры <sup>1</sup>H-ЯМР получали на устройстве Varian Gemini 2000 (400 МГц) при стандартных условиях наблюдения. Масс-спектрометрическую идентификацию соединений осуществляли методом ионизации электрораспылением (ESMS) на устройстве Applied Biosystems (Foster City, CA) модели API 150 EX или устройстве Waters (Milford, MA) 3100, соединенном с системами автоочистки.

#### Условия препаративной ВЭЖХ

Колонка:	C18, 5 мкм. 21,2 × 150 мм или C18, 5 мкм 21 × 250 или C14, 5 мкм 21 × 150 мм
Температура колонки:	Комнатная температура
Скорость потока:	20,0 мл/мин
Подвижные фазы:	A=Вода+0,05% TFA B=ACN+0,05% TFA,
Объем вводимой пробы:	(100-1500 мкл)

Длина волны детектора: 214 нм

Неочищенные соединения растворяли в смеси 1:1 вода:уксусная кислота при около 50 мг/мл. Осуществляли 4-минутный анализ в аналитическом масштабе с использованием колонки C18 2,1 × 50 мм, а затем 15- или 20-минутный анализ в препаративном масштабе с использованием вводимой пробы объемом 100 мкл с градиентом, основанным на удерживании% В при осуществлении анализа в аналитическом масштабе. Точные градиенты зависели от образца. Образцы с близко расположенными примесями проверяли на колонке C18 21 × 250 мм и/или колонке C14 21 × 150 мм для лучшего разделения. Фракции, содержащие желаемый продукт, идентифицировали при помощи масс-спектрометрического анализа.

#### Условия аналитической ВЭЖХ

##### Метод А

Колонка: Agilent Zorbax Bonus-RP C18, 150 × 4,60 мм, 3,5 микрон

Температура колонки: 40°C

Скорость потока: 1,5 мл/мин

Объем вводимой пробы: 5 мкл

Подготовка образца: Растворить в смеси 1:1 ACN:1 М HCl

Подвижные фазы: A=Вода:TFA (99,95:0,05)  
B=ACN:TFA (99,95:0,05)

Длина волны детектора: 254 нм и 214 нм

Градиент: всего 26 мин (время (мин)/% B): 0/5, 18/90, 22/90, 22,5/90, 26/5

##### Метод В

Колонка: Agilent Poroshell 120 Bonus-RP, 4,6 × 150 мм, 2,7 мкм

Температура колонки: 30°C

Скорость потока: 1,5 мл/мин

Объем вводимой пробы: 10 мкл

Подвижные фазы: A=ACN:Вода:TFA (2:98:0,1)  
B=ACN:Вода:TFA (90:10:0,1)

Подготовка образца: Растворить в подвижной фазе В

Длина волны детектора: 254 нм и 214 нм

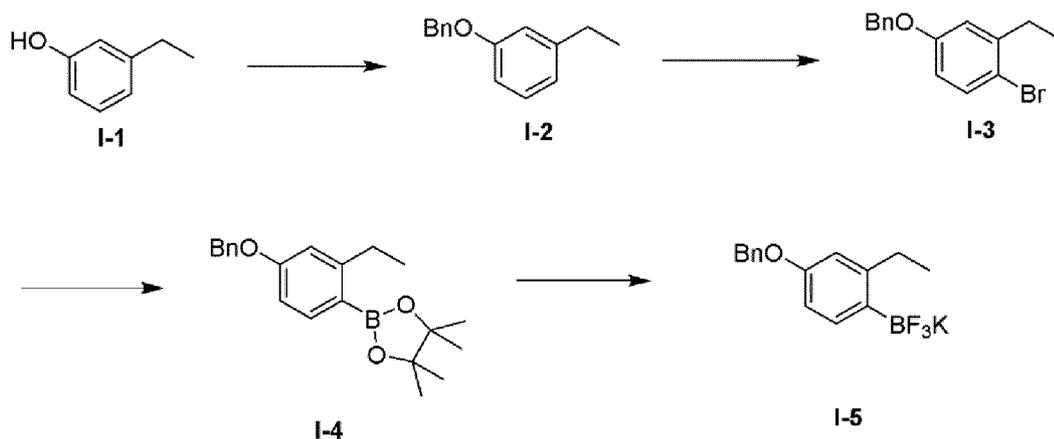
Градиент: всего 60 мин (время (мин)/% B): 0/0, 50/100, 55/100, 55,1/0, 60/0

##### Метод С

Колонка:	Agilent Poroshell 120 Bonus-RP, 4,6 × 150 мм, 2,7 мкм
Температура колонки:	30°C
Скорость потока:	1,5 мл/мин
Объем вводимой пробы:	10 мкл
Подвижные фазы:	A=ACN:Вода:TFA (2:98:0,1) B=ACN:Вода:TFA (90:10:0,1)
Подготовка образца:	Растворить в подвижной фазе B (0,15 мл), затем разбавить Подвижной фазой A (0,85 мл)
Длина волны детектора:	245 нм
Градиент:	всего 46 мин (время (мин)/% B): 0/0, 25/50, 35/100,40/100, 40,1/0, 46/0

### Получение 1: (4-(бензилокси)-2-этилфенил)трифтор-λ<sup>4</sup>-боран, калиевая соль I-5

5



#### (а) 1-(бензилокси)-3-этилбензол (I-2)

К перемешиваемому раствору 3-этилфенола (I-1) (25,0 г, 204,0 ммоль) в ACN (250 мл, 10 об.) добавляли карбонат калия (42,0 г, 306 ммоль) при комнатной температуре. Полученную реакционную массу перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут с последующим добавлением по каплям бензилбромида (24,0 мл, 204 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивали в течение 6 часов при комнатной температуре. После завершения реакции (контролировали методом ТСХ) полученную реакционную массу выливали в воду (1,0 л) с последующей экстракцией соединения при помощи EtOAc (2 × 2 л). Объединенные органические слои промывали холодной водой, насыщенным солевым раствором и сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт затем очищали колоночной хроматографией на силикагеле (100-200М), используя в качестве элюента 2% EtOAc в гексане, с получением желаемого продукта (I-2) в виде светло-желтого маслянистого соединения (35,0 г, 81%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 7,46-7,44 (м, 2H), 7,39 (т,

J=7,6 Гц, 2H), 7,34-7,31 (м, 1H), 7,21 (т, J=7,6 Гц), 6,86-6,80 (м, 3H), 5,07 (с, 2H), 2,64 (кв, J=7,6 Гц, 2H), 1,24 (т, J=7,6 Гц, 3H).

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

К охлажденному льдом перемешиваемому раствору 1-(бензилокси)-3-этилбензола (**I-2**) (35,0 г, 164 ммоль) в ACN (525 мл, 15 об.) добавляли N-бромсукцинимид (32,0 г, 181 ммоль) порциями в течение 15 минут. Полученную реакционную смесь перемешивали еще 1 час при комнатной температуре. После завершения реакции (контролировали методом ТСХ) полученную реакционную массу выливали в ледяную воду (1,50 л) с последующей экстракцией соединения при помощи EtOAc (2 × 1 л). Объединенные органические слои промывали водой и сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. К неочищенному веществу добавляли н-гексан (250 мл), получая взвесь, после чего фильтровали через воронку из спеченного стекла. Маточный раствор упаривали при пониженном давлении с получением желаемого продукта **I-3** в виде светло-желтого маслянистого соединения (42,0 г, 87%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 7,52-7,29 (м, 7H), 6,88 (с, 1H), 6,68 (д, J=6,0 Гц, 1H), 5,04 (с, 2H), 2,69 (кв, J=7,6 Гц, 2H), 1,20 (т, J=7,5 Гц, 3H).

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

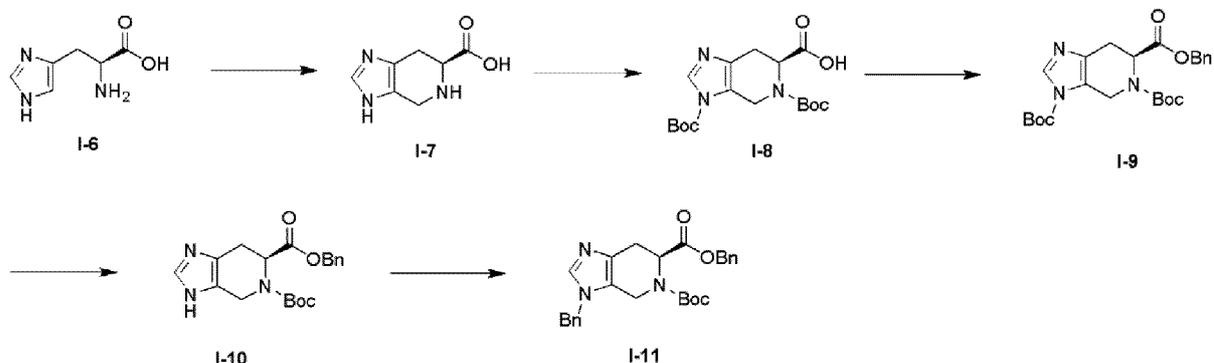
Перемешиваемый раствор 4-(бензилокси)-1-бром-2-этилбензола (**I-3**) (42,0 г, 144 ммоль), бис(пинаколато)дибора (44,0 г, 173 ммоль) и ацетата калия (28 г, 288 ммоль) в диоксане (440 мл) дегазировали путем продувки N<sub>2</sub> (газ) в течение 15 мин, затем добавляли комплекс PdCl<sub>2</sub>(dppf) с DCM (11,0 г, 15 ммоль). Полученную реакционную смесь нагревали до 80°C еще 16 ч. После завершения реакции (контролировали методом ТСХ) реакционную массу фильтровали через слой целита и маточный раствор упаривали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (100-200M), используя в качестве элюента 1% EtOAc в гексане, с получением желаемого продукта (**I-4**) в виде светло-желтого маслянистого соединения (32,0 г, 66%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 7,74 (д, J=8,4 Гц, 1H), 7,45-7,36 (м, 5H), 6,84-6,78 (м, 2H), 5,08 (с, 2H), 2,91 (кв, J=7,6 Гц), 1,33 (с, 12H), 1,19 (т, J=7,6 Гц, 3H).

(d) (4-(бензилокси)-2-этилфенил)трифтор-λ<sup>4</sup>-боран, калиевая соль (**I-5**)

К перемешиваемому раствору соединения 2-(4-(бензилокси)-2-этилфенил)-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолана (**I-4**) (20 г, 59,0 ммоль) в смеси ацетон:метанол (200 мл, соотношение 1:1, 10 об.) добавляли 3M раствор гидрофторида калия (23,0 г, 295 ммоль, растворенный в 98,0 мл воды). Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. После завершения реакции (контролировали методом ТСХ) полученную реакционную массу упаривали при пониженном давлении. Полученное таким образом твердое вещество помещали в воду (100 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Полученную реакционную массу фильтровали через воронку из спеченного стекла, промывали н-гексаном и сушили при

пониженном давлении с получением желаемого продукта (**I-5**) в виде белого твердого вещества (14,0 г, 74%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, хлороформ-d)  $\delta$  7,43 (д,  $J=7,2$  Гц, 2H), 7,37 (т,  $J=7,5$  Гц, 2H), 7,30 (т,  $J=7,1$  Гц, 1H), 7,22 (д,  $J=8,0$  Гц), 6,58 (с, 1H), 6,53 (д,  $J=7,9$  Гц, 1H), 5,00 (с, 2H), 2,65 (кв,  $J=7,5$  Гц, 2H), 1,07 (т,  $J=7,4$  Гц, 3H).

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



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

К охлажденной льдом суспензии L-гистидина (**I-6**) (5,0 кг, 32,14 моль) в воде (40 л, 8 об.) добавляли концентрированную хлористоводородную кислоту (3,93 л, 33,75 моль) с последующим добавлением по каплям формальдегида (5,50 л, 67,5 моль, 37% водн. раствор). Полученный раствор перемешивали в течение 30 минут при той же температуре и затем нагревали при  $80^\circ\text{C}$  в течение 8 часов. За ходом реакции наблюдали при помощи ЖХМС. Воду удаляли при пониженном давлении с получением неочищенного продукта и полученный неочищенный продукт перемешивали в течение 2 часов в толуоле (20 л). Органические вещества удаляли при пониженном давлении для удаления избытка воды, и соединение подвергали азеотропной сушке. Полученное вещество затем помещали в диэтиловый эфир (20 л) и перемешивали в течение 2 часов. Твердое вещество затем фильтровали и сушили на воздухе с получением желаемого продукта (**I-7**) в виде не совсем белого твердого вещества (6,50 кг, 85%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8,69 (с, 1H), 4,56 (д,  $J=15,4$  Гц, 1H), 4,42 (д,  $J=15,5$  Гц, 1H), 4,20 (дд,  $J=5,5, 5,2$  Гц, 1H), 3,42 (дд,  $J=5,0, 17,0$  Гц, 1H), 3,11 (дд,  $J=10,2, 16,8$  Гц, 1H).

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

К охлажденному льдом перемешиваемому раствору дигидрохлорида (S)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновой кислоты (**I-7**) (6,10 кг, 25,40 моль) в 1,4-диоксане (48 л, 8 об.) и воде (48 л, 8 об.) добавляли триэтиламин (12,36 л, 89 моль) по каплям с последующим добавлением ди-трет-бутил дикарбоната (18,07 л, 78,74 моль, растворенный в 5 л 1,4-диоксана) в течение 30 мин. Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре еще 16 часов. После завершения реакции (контролировали методом ТСХ и ЖХМС) желтоватую реакционную смесь разбавляли

водой (10 л) и промывали последовательно диэтиловым эфиром (2 × 10 л) и EtOAc (2 × 7,50 л). Органическую фазу отбрасывали. Водный слой охлаждали и доводили до pH ~3 6N раствором HCl; водную фазу экстрагировали при помощи EtOAc (3 × 10 л). Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором, сушили над сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении. Маслянистый остаток кристаллизовали из смеси 30% EtOAc:гексан с получением желаемого продукта (**I-8**) в виде не совсем белого твердого вещества (5,1 кг, 55%). (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчитано для C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> 368,18 найдено 368,21.

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

К ледяному раствору (S)-3,5-бис(*трет*-бутоксикарбонил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновой кислоты (**I-8**) (5,1 кг, 13,88 моль) в DCM (51 л, 10 об.) добавляли последовательно насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (41,0 л, 8 об.), йодид тетра-бутиламмония (5,13 кг, 13,88 моль) и бензилбромид (2,47 л, 20,82 моль). Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре еще 16 часов. После завершения реакции (контролировали методом ТСХ и ЖХМС) двухфазный раствор разделяли. Водный слой экстрагировали при помощи DCM (3 × 10 л). Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали колоночной хроматографией на силикагеле (100-200M), используя в качестве элюента 40% EtOAc в гексане, с получением желаемого продукта (**I-9**) в виде вязкого масла (4,50 кг, 72%). (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчитано для C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> 458,22, найдено 458,60.

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

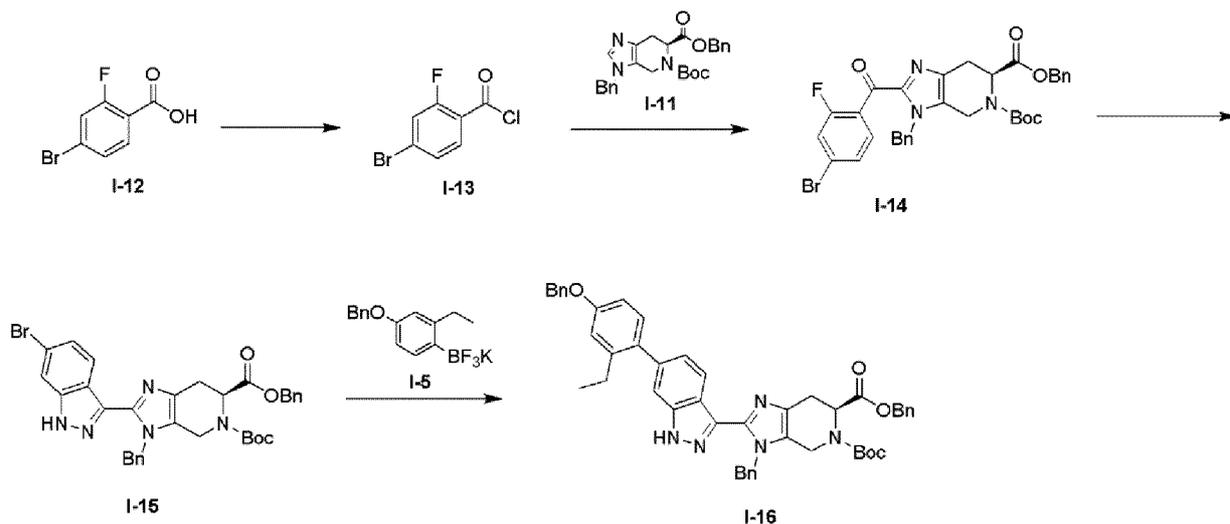
К ледяному раствору 6-бензил 3,5-ди-*трет*-бутил (S)-6,7-дигидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-3,5,6(4H)-трикарбоксилата (**I-9**) (4,50 кг, 9,84 моль) в IPA (45 л, 10 об.) по каплям добавляли гидроксид аммония (36 л, 8 об.). Полученную реакционную смесь дополнительно перемешивали при комнатной температуре еще 16 часов. После завершения реакции (контролировали методом ТСХ и ЖХМС) полученную смесь разбавляли водой (25 л) с последующей экстракцией при помощи EtOAc (3 × 20 л). Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали колоночной хроматографией на силикагеле (100-200M), используя в качестве элюента 2% MeOH в DCM, с получением желаемого продукта (**I-10**) в виде густого вязкого масла (2,70 кг, 77%). (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчитано для C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 358,17, найдено 358,33.

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

К ледяному раствору 6-бензил 5-(*трет*-бутил) (S)-3,4,6,7-тетрагидро-5H-

имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилата (**I-10**) (2,70 кг, 7,55 моль) в DCM (32,4 л, 12 об.) добавляли 1N водный раствор гидроксида натрия (24,3 л, 9 об.) с последующим последовательным добавлением йодида тетрабутиламмония (2,80 кг, 7,55 моль) и бензилбромида (0,99 л, 8,31 моль). Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре еще 2 часа. После завершения реакции (контролировали методом ТСХ и ЖХМС) двухфазный раствор разделяли. Водный слой экстрагировали при помощи DCM (3 × 10 л). Объединенные органические слои промывали насыщенным солевым раствором, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали колоночной хроматографией на силикагеле (100-200M), используя в качестве элюента 40% EtOAc в гексане, с получением желаемого продукта (**I-11**) в виде вязкого масла (1,70 кг, 63%). (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчитано для C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 448,22, найдено 448,20.

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



(a) 4-бром-2-фторбензоилхлорид (**I-13**)

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

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

К перемешиваемому раствору 6-бензил 5-(трет-бутил) (S)-3-бензил-3,4,6,7-

тетрагидро-5Н-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилата (**I-11**) (1,70 кг, 3,80 моль) в АСN (13,6 л, 8 об.) добавляли триэтиламин (2,11 л, 15,2 моль) с последующим добавлением 4-бром-2-фторбензоилхлорида (**I-13**) (1,08 кг, 4,56 моль в 3,4 л АСN, 2 об.) при комнатной температуре. После завершения добавления цвет полученной реакционной смеси менялся от светло-желтого до коричневого. Полученную реакционную смесь перемешивали при той же температуре в течение 30 мин и развитие реакции отслеживали методом ТСХ. Полученную реакционную смесь гасили ледяной водой (10 л), затем экстрагировали при помощи EtOAc (3 × 5 л) и объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором. Органические слои сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали колоночной хроматографией на силикагеле (100-200M), используя в качестве элюента 20% EtOAc в гексане, с получением желаемого продукта (**I-14**) (1,74 кг, 71%). (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчитано для C<sub>33</sub>H<sub>31</sub>BrFN<sub>3</sub>O<sub>5</sub> 648,14 найдено 648,20.

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

К перемешиваемому раствору 6-бензил 5-(*трет-бутил*) (S)-3-бензил-2-(4-бром-2-фторбензоил)-3,4,6,7-тетрагидро-5Н-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилата (**I-14**) (1,74 кг, 2,68 моль) в THF (26,0 л, 15 об.) добавляли гидразингидрат (0,705 л, 13,4 моль) при комнатной температуре. Полученную реакционную смесь нагревали при 60°C в течение 3 часов. После завершения реакции (контролировали методом ТСХ) полученную реакционную массу выливали в ледяную воду (10 л) с последующей экстракцией соединения при помощи EtOAc (3 × 10 л). Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором и сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали колоночной хроматографией на силикагеле (100-200M), используя в качестве элюента 20% EtOAc в гексане, с получением желаемого продукта (**I-15**) в виде не совсем белого твердого вещества (1,12 кг, 65%). (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчитано для C<sub>33</sub>H<sub>32</sub>BrN<sub>5</sub>O<sub>4</sub> 642,16 найдено 642,21.

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

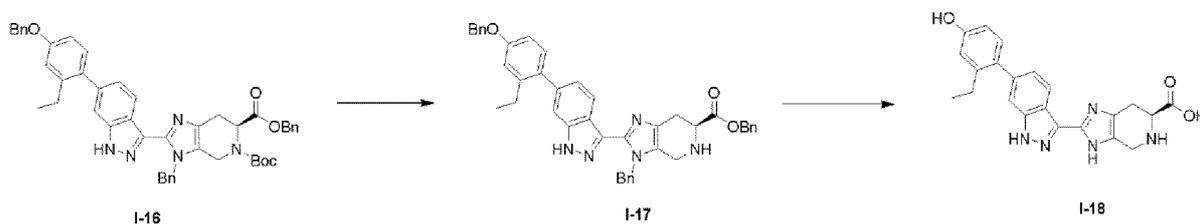
Бис(пинаколато)дифторид (250 г, 984 ммоль) загружали в 5-л 3-горлую одностенную колбу, предварительно протравленную с использованием фторидной химии, вместе с пропан-2-олом (1882 мл, 2,46E+04 ммоль) и смесь перемешивали до полного растворения. Растворение было эндотермическим (-4°C). В 4-л колбе Эрленмейера, предварительно протравленной с использованием фторидной химии, фторид калия гидрофторид (538 г, 6891 ммоль) растворяли в воде (2,306 л, 1,28E+05 ммоль) с образованием 3M раствора. Растворение было эндотермическим (-12°C). Раствор затем фильтровали для удаления небольшого количества нерастворимого вещества из фторида калия гидрофторида. Когда оба раствора были полностью растворены, содержимое колбы Эрленмейера загружали в

одностенную колбу по порциям в течение 15 минут. Наблюдали умеренную экзотерму ( $+10^{\circ}\text{C}$ ). В процессе добавления раствор превращался в густую и полупрозрачную серую суспензию, и перемешивание усиливали, чтобы содержимое оставалось хорошо смешиваемым. Смесь перемешивали в течение 1,5 ч и затем фильтровали через крупнопористую воронку (4 л, предварительно протравленную). Фильтрация занимало 30-45 минут. Прозрачный двухфазный фильтрат отбрасывали. Белые твердые вещества сушили в течение 10 минут на фильтре (наблюдали растрескивание лепешки). Твердые вещества переносили обратно чистую 5-л 3-горлую одностенную колбу и ресуспендировали водой (1,33 л,  $7,38\text{E}+04$  ммоль). Суспензию перемешивали в течение 2 ч, после этого она превращалась в прозрачный гомогенный гидрогель. Раствор перемешивали еще в течение 1 ч, затем твердые вещества/гель отфильтровывали с использованием 4-л крупнопористой воронки (предварительно протравленной). Твердые вещества оставляли высушиваться на фильтре в течение 30 минут. Твердые вещества переносили обратно в чистую 5-л 3-горлую одностенную колбу и ресуспендировали в ацетоне (1,084 л,  $1,48\text{E}+04$  ммоль). Белую/серую суспензию перемешивали в течение 1 ч и затем фильтровали на 4-л крупнопористой воронке (предварительно протравленной). Фильтрация занимало 20 минут, а затем вещество сушили на воронке еще в течение 1 ч. В течение этого времени твердые вещества периодически встряхивали для обеспечения гомогенной сушки. После сушки на фильтре остался легкий белый порошок. Твердые вещества сушили в течение 20 ч при  $55^{\circ}\text{C}$  в вакууме с медленным отводом азота с получением рыхлого белого твердого вещества (было собрано 200,3 г).

К перемешиваемому раствору 6-бензил 5-(*трет-бутил*) (S)-3-бензил-2-(6-бром-1H-индазол-3-ил)-3,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилата (**I-15**) (10,0 г, 16,0 ммоль) в 2-метилтетрагидрофуране (100 мл, 10 об) добавляли (4-(бензилокси)-2-этилфенил)трифтор- $\lambda^4$ -боран, калиевую соль (**I-5**) (8,0 г, 20 ммоль), и полученное выше рыхлое белое твердое вещество (0,20 г). Полученную реакционную смесь дегазировали газообразным азотом в течение 30 минут. К этому раствору добавляли полученный водный раствор карбонатцезия (20,0 г, 62,0 ммоль в 60 мл воды, 6 об). Полученную реакционную смесь снова дегазировали в течение 15 минут, затем добавляли бис(*трет-бутил*(4-диметиламинофенил)фосфин)дихлорпалладий(II) (0,66 г, 0,93 ммоль) и реакционную смесь вакуумировали в вакууме и продували азотом. Полученную реакционную смесь нагревали при  $110^{\circ}\text{C}$  в течение 20 часов. После завершения реакции (контролировали методом ТСХ и ЖХМС) полученную реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через слой целита, затем снова промывали при помощи EtOAc ( $3 \times 0,5$  л). Объединенные органические слои промывали 1N раствором гидроксида натрия ( $3 \times 0,5$  л). Объединенные органические слои затем промывали насыщенным солевым раствором и сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали колоночной хроматографией на силикагеле (100-200M), используя в качестве элюента 20% EtOAc в гексане, с получением желаемого продукта (**I-16**) (в виде смеси N-

бензил региоизомеров) в виде светло-желтого твердого вещества (8,0 г, 66%). (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчитано для C<sub>48</sub>H<sub>47</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> 774,36 найдено 774,59.

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



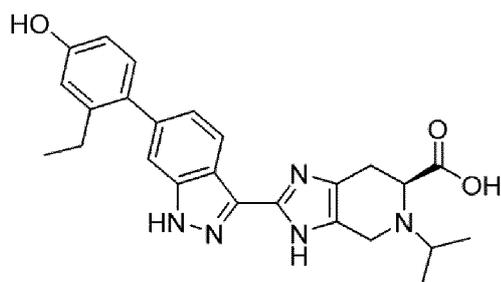
(a) Бензил (S)-3-бензил-2-(6-(4-(бензилокси)-2-этилфенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоксилат, гидрохлорид (**I-17**)

6-Бензил 5-(*трет-бутил*) (S)-3-бензил-2-(6-(4-(бензилокси)-2-этилфенил)-1H-индазол-3-ил)-3,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилат (**I-16**) (1,0 г, 1,292 ммоль) растворяли в диоксане (8 мл) и воде (1,5 мл), затем добавляли раствор хлористого водорода, 4 М в диоксане (7 мл, 28,0 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов (развитие реакции контролировали при помощи ЖХМС). Реакционную смесь затем замораживали и лиофилизировали и неочищенный продукт (**I-17**) использовали непосредственно в следующей реакции (предполагался количественный выход). (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчитано для C<sub>43</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> 674,31 найдено 674,3.

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

Бензил (S)-3-бензил-2-(6-(4-(бензилокси)-2-этилфенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоксилат гидрохлорид (**I-17**) (0,918 г, 1,292 ммоль) растворяли в 2-пропанол (15 мл), растворе хлористого водорода, 5 М в воде (0,258 мл, 1,292 ммоль), и воде (0,25 мл) при 50°C, затем добавляли палладий, 10% масс. на угле, 50% воды (0,138 г, 0,065 ммоль). Затем реакционную колбу продували азотом, присоединяли баллон с водородом и реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 4 дней, при этом баллон с водородом пополняли по мере необходимости (развитие реакции контролировали при помощи ЖХМС). Затем все твердые вещества удаляли фильтрованием и полученный раствор концентрировали. Остаток растворяли в смеси 1:1 АСN/Вода, замораживали и лиофилизировали. Полученный порошок (**I-18**) использовали без дополнительной очистки (предполагался количественный выход). (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчитано для C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> 404,17 найдено 404,2.

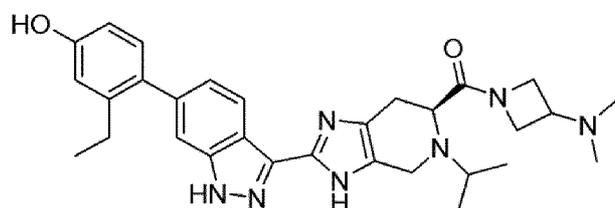
**Получение 5:** (S)-2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновая кислота (**I-19**)



I-19

(S)-2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновую кислоту HCl (**I-18**) (0,25 г, 0,568 ммоль) суспендировали в DMF (2,5 мл) и ацетоне (2,5 мл), затем добавляли уксусную кислоту (0,098 мл, 1,705 ммоль) и цианоборгидрид натрия (0,179 г, 2,84 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов (за ходом реакции наблюдали при помощи ЖХМС). Реакционную смесь концентрировали, затем неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой хроматографией (градиент 5-70% ACN/вода, колонка C18aq 50 г) с получением TFA соли указанного в заголовке соединения (149 мг, 47% выход). (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчитано для C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> 446,21 найдено 446,3.

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

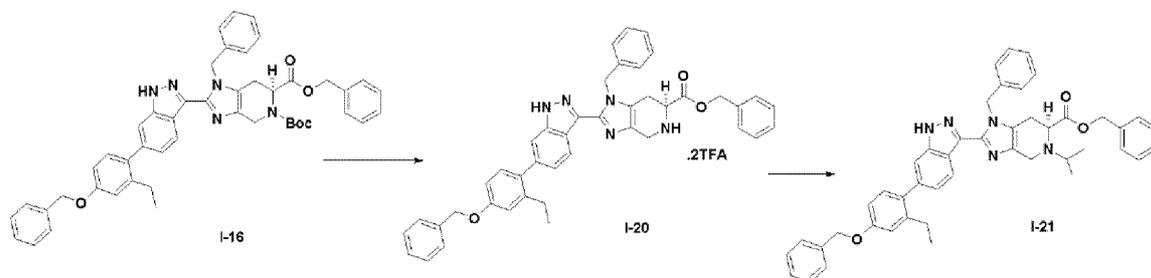


1

(S)-2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновую кислоту, TFA (**I-19**) (50 мг, 0,089 ммоль), 3-(диметиламино)азетидин дигидрохлорид (23,20 мг, 0,134 ммоль) и DIPEA (0,078 мл, 0,447 ммоль) растворяли в DMF (1,5 мл), затем добавляли HATU (51,0 мг, 0,134 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов (за ходом реакции наблюдали при помощи ЖХМС). Для расщепления нежелательных побочных продуктов добавляли гидразин (0,014 мл, 0,447 ммоль) и раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем реакционную смесь концентрировали и неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (градиент 5-70% ACN/вода, колонка C18) с получением TFA соли указанного в заголовке соединения (25 мг, 37% выход). (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчитано для C<sub>30</sub>H<sub>37</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> 528,30 найдено 528,3. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 13,09 (с, 1H), 9,40 (с, 1H), 8,27 (д, J=8,31, 1H), 7,30 (с, 1H),

7,04 (м, 2H), 6,71 (д, J=2,54, 1H), 6,64 (дд, J=2,53, 8,26, 1H), 4,26 (м, 1H), 4,06 (м, 2H), 3,82 (м, 2H), 3,64 (м, 2H), 3,03 (м, 2H), 2,74 (м, 2H), 2,47 (кв, J=7,56, 2H), 2,07 (д, J=3,69, 6H), 1,07 (м, 6H), 1,00 (т, J=7,50, 3H).

**Получение 6:** бензил (S)-1-бензил-2-(6-(4-(бензилокси)-2-этилфенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоксилат (I-21)



### Стадия 1

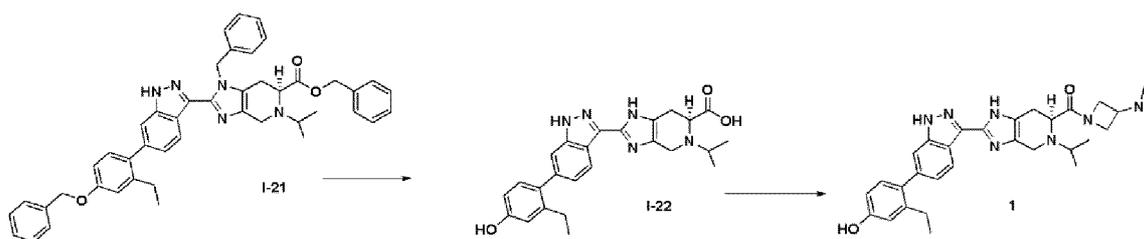
В трехгорлую высушенную круглодонную колбу добавляли соединение I-16 (550 г, 0,71 моль). Соединение растворяли в DCM (4125 мл) при комнатной температуре (24-25°C) с получением прозрачного бледно-желтого раствора. Раствор охлаждали до 0°C (смесь льда и соли) в течение следующих 30 минут (внешняя температура составляла -5°C). Затем через капельную воронку медленно добавляли TFA (1375 мл) в течение 45 мин. Реакционную смесь перемешивали в течение 10 мин при этой же температуре (0°C). Реакционную массу нагревали до 30°C и перемешивали при этой же температуре в течение 1,5 ч. Развитие реакции отслеживали методом ТСХ, а также ЖХМС. После завершения реакции реакционную смесь упаривали при пониженном давлении при 40°C с получением неочищенного вещества в виде густой вязкой массы светло-коричневого цвета. Отгонку гептаном осуществляли дважды, добавляя каждый раз по 2,5 л гептана и выпаривая досуха. Затем соединение сушили в высоком вакууме. Желаемый продукт **I-20** получали в виде густой вязкой жидкости (641 г, 100% выход, ЖХМС= 94,35% чистота).

### Стадия 2

В трехгорлую высушенную круглодонную колбу загружали молекулярные сита 4A° (641 г, масс/масс), затем добавляли 8 объемов ацетона (5,13 л) одной порцией в инертной атмосфере при комнатной температуре (25°C). Наблюдали белую суспензию. Полученное на стадии 1 вещество (641 г, 0,71 моль, растворенное в 7,690 л (12 объемов) ацетона) медленно добавляли в колбу в течение 10 минут во избежание образования липкой массы внутри колбы. Наблюдали светло-желтую окраску реакционной массы. Добавляли по каплям CH<sub>3</sub>COOH (15,4 мл, 0,266 моль) при 25°C и полученную реакционную массу перемешивали при этой же температуре в течение 30 мин. Наблюдали темно-желтую суспензию. Порциями добавляли триацетоксиборгидрид натрия (297 г, 1,4 моль) при 25°C в течение 30 мин. Температура поднялась с 25°C до 31°C, и цвет реакционной массы также изменился с темно-желтого на светло-желтый. Полученную реакционную смесь перемешивали при 30°C еще 30 мин. За ходом реакции наблюдали

при помощи ЖХМС и ТСХ. После завершения реакции реакционную смесь охлаждали до 10°C и перемешивали еще 20 мин. Реакционную массу затем фильтровали через слой целита для удаления молекулярных сит и триацетоксиборгидрида натрия. Слой целита, использованный для фильтрации, промывали 10 объемами 2-Ме-ТНФ (6,41 л) и отдельно брали 2-Ме-ТНФ. Полученный выше ацетоновый маточный раствор упаривали при пониженном давлении досуха, получая густую вязкую жидкость. Полученную вязкую жидкость растворяли в 2-Ме-ТНФ (6,41 л), который использовали для промывки слоя целита. К органическому слою (2-Ме-ТНФ) добавляли 10% водн. раствор NaHCO<sub>3</sub> (~5,5 л) для доведения pH до около 7,02. В этот момент наблюдалось незначительное газовыделение, которое прекратилось через 5 минут. Двухфазный слой и органический слой разделяли. Органический слой дополнительно промывали водой (2,0 л, дважды). Органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и упаривали при пониженном давлении при 45°C с получением бензил (S)-1-бензил-2-(6-(4-(бензилокси)-2-этилфенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоксилата (**I-21**) в виде светло-желтоватого пенистого твердого вещества (500 г), 95,73% чистота по ВЭЖХ. Было получено 11 партий в одном масштабе, и полученные вещества объединяли. Получали взвесь соединения в гептане (5 объемов) и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Соединение фильтровали и промывали гептаном (2 объема). Влажную лепешку сушили в вакуумной полочной сушилке в течение 24 часов без воздействия какой-либо внешней температуры с получением 5,40 кг соединения **I-21**.

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



#### Стадия 1:

В 3-горлую круглодонную колбу загружали бензил (S)-1-бензил-2-(6-(4-(бензилокси)-2-этилфенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоксилат (1,350 г, 1886 ммоль) и тетрагидрофуран (2025 мл) при перемешивании при 25°C с получением гомогенного прозрачного желтого/оранжевого раствора. К раствору добавляли пропан-2-ол (11,475 мл) и 6M раствор хлористого водорода (водн.) (1257 мл) при перемешивании с получением гомогенного раствора при 25°C. Барботирование азотом использовали для дегазации свободно перемешиваемой желтой суспензии в течение 30 мин. В реактор добавляли 10%

масс. Pd/C, 50% масс. H<sub>2</sub>O (202,5 г, 95 ммоль). Газообразный азот перекрывали, после чего реакционный раствор барботировали H<sub>2</sub> и нагревали до внутренней температуры 65°C. ВЭЖХ показала, что через 210 мин реакция была завершена. Реакционную смесь фильтровали через 10-г слой целита для удаления основного количества катализатора. Собирали прозрачный желтый раствор. В фильтрат загружали 10%(масс/масс) SiliaMetS Thiol (101,25 г, 953 ммоль) (белое твердое вещество) и смесь перемешивали при 50°C в течение 1 часа для удаления остатка Pd. Через 1 час SiliaMetS Thiol отфильтровывали через 0,2 мкм фильтр с получением гомогенного раствора светло-желтого цвета. Затем фильтрат концентрировали до 3× (об.) и выдерживали при 50°C. К концентрированному раствору при 50°C добавляли 3 эквивалента 12М раствора HCl (471 мл, 5657 ммоль). После перемешивания при 50°C в течение 5 мин добавляли 2,025 г затравки и выдерживали при 50°C в течение 1 часа. Суспензия значительно загустевала. Медленно добавляли 15× (об.) ацетонитрила (20250 мл) в течение 120 мин. Партию затем выдерживали при 50°C в течение 2 часов, затем охлаждали до 20°C в течение 3 часов и выдерживали в течение ночи при перемешивании. Затем суспензию фильтровали, фильтровальную лепешку пять раз промывали ACN и сушили в высоком вакууме при 50°C в течение ночи.

После разгрузки получали лепешку в виде бледно-оранжевого твердого вещества, представляющего собой (S)-2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновую кислоту, 2HCl (850 г, 1640 ммоль, 87% выход).

Аналогичную схему использовали для 1,115 кг соединения **I-21** с получением дополнительных 700 г соединения **I-22**. Две полученных партии объединяли.

#### Стадия 2:

В 20-л реактор, снабженный рубашкой, загружали N, N-диметилазетидин-3-амин, 2HCl (432 г, 2497 ммоль) и N, N-диметилацетамид (3750 мл, 4,00E+04 ммоль) при 20°C. Добавляли DIPEA (2699 мл, 1,55E+04 ммоль) при 20°C в течение примерно 5 минут. Смесь перемешивали в течение 15 минут при 20°C, получая мутный раствор, который охлаждали до 10-15°C при перемешивании со скоростью 200 об/мин. (S)-2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновую кислоту, 2,2 HCl (1250 г, 2378 ммоль), добавляли к партии при поддержании температуры ниже 20°C. Во время добавления наблюдали экзотермическую реакцию (наблюдали экзотермическую реакцию при около 7°C). Получали суспензию, которую перемешивали в течение примерно 15 минут при 15-25°C. Через 15 мин все еще наблюдали жидкую суспензию. При внутренней температуре 17°C добавляли NATU (994 г, 2615 ммоль) в течение примерно 5 минут при перемешивании при 350 об/мин при 20 ± 5°C. Во время добавления температура повышалась до 22°C. После добавления NATU получали жидкую суспензию. Партию выдерживали при 20-25°C и перемешивали при скорости перемешивания 215 об/мин, пока реакция не завершилась, т.е. 2 часа. В завершённую реакцию загружали предварительно смешанный охлажденный (5°C)

раствор: 1М водн. HCl (4993 мл, 4993 ммоль), разбавленный 1 объемом воды (1,25 л), поддерживая температуру партии ниже 30°C. К партии добавляли 5 объемов изопропилацетата (6,250 мл) и смесь перемешивали в течение примерно 15 мин. Перемешивание останавливали. Водно-кислотный слой отделяли и переносили в реактор. Органический слой отбрасывали. Было определено, что рН водного слоя составлял 4-5,0. К партии добавляли 5 объемов изопропилацетата (6,250 мл) и перемешивание осуществляли в течение примерно 15 мин при 20°C. Смеси давали отстояться при 20°C. Водно-кислотный слой отделяли и переносили в реактор. Органический слой отбрасывали. К партии добавляли 5 объемов изопропилацетата (6,250 мл) и перемешивали в течение примерно 15 мин при 20°C, затем оставляли отстаиваться при 20°C. Водно-кислотный слой отделяли и переносили в реактор. Органический слой отбрасывали. Водно-кислотный слой хранили при 20°C в течение ночи. В реактор загружали 30 объемов воды (37,5 кг). Добавляли бикарбонат натрия (1238 г, 1,47E+0,4 ммоль) и смесь перемешивали до полного растворения. Перемешивание прекращали и раствор выдерживали при 20°C в течение ночи. К водному раствору при перемешивании добавляли 10 объемов 2-метилтетрагидрофурана (12 500 мл). Наблюдали экзотермическое явление. Внутреннюю температуру доводили до  $20 \pm 5^\circ\text{C}$ . Водно-кислотный слой добавляли в реактор в течение примерно 10 мин. Наблюдали умеренную экзотерму 1°C. Смесь перемешивали при 20°C в течение примерно 15 мин, затем оставляли отстаиваться при 20°C. Нижний водный слой удаляли и добавляли в реактор. Органический слой выделяли и экстрагировали путем загрузки 5 объемов 2-метилтетрагидрофурана (6250 мл) и перемешивания в течение примерно 15 минут при 20°C. Объединенные органические слои концентрировали до 3 объемов (3,75 л) на роторном испарителе при температуре бани 50°C. Добавляли 10 объемов 2-метилтетрагидрофурана (12500 мл) и смесь концентрировали до 3 объемов (3,75 л) на роторном испарителе при температуре бани 50°C. Ацетонитрил (2,00E+0,4 мл) добавляли в 25-л реактор, снабженный рубашкой, и внутреннюю температуру доводили до 0-5°C при перемешивании со скоростью 215 об/мин. Концентрированную партию (около 3,75 л) добавляли в охлажденный ацетонитрил в течение примерно 1 часа при 0-5°C. Смесь оставляли для старения в течение ночи при 0°C при скорости перемешивания 215 об/мин. Смесь фильтровали и фильтровальную лепешку промывали 4 объемами предварительно охлажденного ацетонитрила (5000 мл) при 0°C. Фильтровальную лепешку сушили на фильтре под давлением газообразного N<sub>2</sub> в течение 2 часов. Мокрую лепешку затем сушили в высоком вакууме (с небольшой продувкой N<sub>2</sub>) при 50°C в течение ночи с получением (S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-ил)метанона (1150 г, 2179 ммоль, выход 92%) в виде аморфного твердого вещества. Вторую партию вещества получали таким же способом с получением 1036 г (S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-ил)метанона в виде аморфного твердого вещества

(подтверждено PXRD) и две партии были объединяли.

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

(S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-ил)метанон (95 г, 180 ммоль) растворяли в 1M HCl (водн.) (950 мл) и изопропилацетате (950 мл) при 30°C. Партию выдерживали при 30°C в течение 30 мин, затем слои разделяли. Это повторяли три раза, всегда сохраняя нижний водный слой и удаляя изопропилацетатный слой. После четвертой экстракции водного слоя изопропилацетатом добавляли 2-метилтетрагидрофуран (950 мл, 9419 ммоль), а затем достаточное количество 10% бикарбоната натрия, чтобы довести pH до 7,5. Смесь перемешивали в течение 30 мин и разделяли слои. Водный слой экстрагировали 2-метилтетрагидрофураном (250 мл). 2-Метилтетрагидрофурановый слой объединяли. Замену растворителя с 2-метилтетрагидрофурана на ацетонитрил осуществляли для осаждения продукта из раствора. После фильтрации и сушки получали лепешку 89 г неочищенного (S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-ил)метанона. Это твердое вещество (89 г) растворяли в 445 мл метанола. После перемешивания до полного растворения смесь фильтровали через фильтр 0,2 мкм. Затем фильтрат нагревали до внутренней температуры 55°C и выдерживали при перемешивании при этой температуре в течение 60 мин. Некоторое количество осадка начало образовываться, образуя слегка мутный раствор. Затем температуру линейно снижали со скоростью 0,2°C/мин до конечной внутренней температуры 15°C, затем поддерживали на уровне 15°C в течение 8 часов. В это время партия значительно загустевала, и суспензию фильтровали под слоем азота с использованием высокого вакуума. Влажную фильтровальную лепешку выгружали и сушили в течение 18 часов в высоком вакууме (28 мм рт.ст.) в вакуумной печи с установленной температурой 65°C. Затем сухую лепешку выгружали и давали уравниваться с влажностью и температурой окружающей среды с получением конечной кристаллической лепешки белого до не совсем белого цвета, представляющей собой (S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-ил)метанон гидрат, Форму I (75 г, 140 ммоль, 78% выход).

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

В 20-л реактор, снабженный рубашкой, добавляли (S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-ил)метанон (соединение 1, 2186 г, 4143 ммоль), полученный в Получении 7, затем метанол (10930 мл). Полученную суспензию перемешивали и

нагревали до 55°C с получением прозрачного гомогенного раствора. Раствор выдерживали при 55°C в течение 30 мин и вносили затравку (2,186 г вещества, полученного в предыдущем Примере). Раствор выдерживали еще час при 55°C. Произосходила кристаллизация и загустевание. Затем смесь охлаждали до 10°C в течение 450 минут. Партию выдерживали при внутренней температуре 10°C в течение 12 часов, затем фильтровали. Влажную лепешку промывали предварительно охлажденным метанолом (2186 мл) при 5°C. Лепешку сушили на сушильном фильтре под вакуумом с продувкой азотом и рубашкой, нагреваемой до 55°C. Лепешку выдерживали в этих условиях сушки в течение 19 часов. Затем лепешку выгружали и распределяли на поддоне для сушки, а затем оставляли для уравнивания до относительной влажности окружающей среды в течение 30 часов с получением кристаллогидрата (S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-ил)метанона (1411,6 г, 2587 ммоль, 62,4% выход), Формы I, в виде твердого вещества от не совсем белого до бледно-желтого цвета.

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

Метанол (1,250 мл) добавляли к 250 г неочищенного (S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-ил)метанона (соединение 1), полученного аналогично тому, как показано в Примере 2, и полученную суспензию нагревали до 55°C в течение примерно 30 минут с получением гомогенного раствора. Раствор фильтровали через фильтр 0,2 мкм. Фильтрат перемешивали при 55°C в течение примерно 3 часов для инициирования кристаллизации. Температуру полученной жидкой суспензии доводили до 5°C в течение примерно 250 минут. Загустевшую суспензию перемешивали при 5°C в течение ночи. Твердые вещества затем отделяли при помощи работающего под давлением фильтра. Фильтровальную лепешку промывали метанолом (250 мл), предварительно охлажденным до 5°C, а затем сушили в высоком вакууме при 55°C в течение ночи с получением 180 г кристаллического вещества. К 180 г полученного кристаллического вещества добавляли метанол (900 мл). Температуру перемешиваемой суспензии доводили до 55°C в течение примерно 30 минут. Суспензию перемешивали при 55°C в течение примерно 3 часов. Температуру суспензии затем доводили до 5-15°C в течение примерно 200 минут. Суспензию перемешивали при 5-15°C еще в течение примерно 2 часов. Твердые вещества отделяли с использованием работающего под давлением фильтра в инертных условиях. Фильтровальную лепешку промывали метанолом, предварительно охлажденным до 5-15°C (300 мл), а затем сушили под высоким вакуумом в вакуумной печи в течение примерно 12 часов при 55-65°C. Сухую лепешку выдерживали при температуре, давлении и относительной влажности окружающей среды в течение примерно 12 часов с получением 165,7 г кристаллического

моногидрата (S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-ил)метанона (Форма I) в виде твердого вещества от не совсем белого до светло-желтого цвета с чистотой 97,7% по данным ВЭЖХ.

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

(S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-ил)метанон получали, следуя такой же процедуре получения, которая показана в Получении 7, стадия 2. Полученное твердое вещество (0,100 г, 0,183 ммоль) растворяли в этаноле (0,5 мл, 0,183 ммоль) при 50°C в течение 5 часов, за это время образовалась суспензия. Суспензию фильтровали при этой температуре в инертных условиях и сушили в сушильном шкафу под вакуумом при 60°C в течение 12 часов с последующим уравниванием при комнатной температуре и давлении в течение 12 часов с получением Формы I (0,06 г).

#### **Примеры 6-10: Свойства кристаллической формы**

Образцы кристаллогидрата (S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-ил)метанона (соединение 1), Формы I, анализировали методом порошковой рентгеновской дифракции (PXRD), дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), термогравиметрического анализа (TGA), динамической сорбции влаги (DMS) и рентгеновской дифракции монокристаллов.

#### **Пример 6 Порошковая рентгеновская дифракция**

Порошковые рентгеновские дифрактограммы Фиг. 1 получали с использованием рентгеновского дифрактометра Bruker D8-Advance, оснащенного детектором Lynxeye 1D, с использованием Cu-K $\alpha$ -излучения ( $\lambda=1,54051 \text{ \AA}$ ) с напряжением на выходе 45 кВ и током 40 мА. Устройство работало в геометрии Брэгга-Брентано с щелями падения, расхождения и рассеивания, установленными так, чтобы максимизировать интенсивность на образце. Для измерения небольшое количество порошка (5-25 мг) аккуратно прижимали к держателю образца для образования гладкой поверхности и подвергали рентгеновскому облучению. Образцы сканировали в режиме 2 $\theta$ -2 $\theta$  от 2° до 35° в 2 $\theta$  с размером шага 0,02° и скоростью сканирования 2 секунды на шаг, в общей сложности 1 час сканирования. Сбор данных контролировали с использованием измерительного программного обеспечения Bruker DiffraSuite и анализировали с использованием программного обеспечения Jade (версия 7.7). Наблюдаемые положения пиков PXRD 2 $\theta$  и интервалы d показаны в Таблице 1 для кристаллогидрата соединения 1, Формы I.

**Таблица 1**

**Данные PXRD для формы I кристаллогидрата**

2 $\theta$	d(Å)	Площадь	A %
5,68	15,56	40,1	100,0
8,49	10,40	10,6	26,4

10,43	8,47	18,2	45,5
10,94	8,08	13,2	32,9
11,55	7,65	8,1	20,3
12,20	7,25	6,9	17,3
13,08	6,76	13,7	34,3
15,94	5,56	15,1	37,6
16,24	5,45	3,3	8,2
17,06	5,19	6,2	15,6
17,60	5,04	745,5	4,8
18,41	4,82	2,3	5,6
18,82	4,71	2,3	5,8
18,96	4,68	4,3	10,6
21,90	4,06	2,5	6,1
22,08	4,02	4,4	11,1
22,27	3,99	5	12,6
24,55	3,62	4,3	10,9
26,29	3,39	3,4	8,4

#### **Пример 7: Термический анализ**

Дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) осуществляли с использованием TA Instruments Model Discovery DSC. Данные собирали с использованием программного обеспечения TRIOS и анализировали с использованием программного обеспечения TA Instruments Universal Analysis. Образец кристаллической формы точно отвешивали в алюминиевой чаше, закрытой герметичной крышкой с точечным отверстием TZero. Образец сначала охлаждали до  $-20^{\circ}\text{C}$ , после чего образец нагревали с использованием линейного нагрева со скоростью  $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  от  $-20^{\circ}\text{C}$  до  $250^{\circ}\text{C}$ . Репрезентативная DSC термограмма Формы I показана на Фиг. 2.

Термогравиметрический анализ (TGA) осуществляли с использованием модуля TA Instruments Model Discovery TGA, оснащенного возможностью высокого разрешения. Данные собирали с использованием программного обеспечения TA Instruments TRIOS и анализировали с использованием программного обеспечения TA Instruments Universal Analysis. Взвешанный образец помещали на платиновую чашку и сканировали со скоростью нагрева  $10^{\circ}\text{C}$  в минуту от температуры окружающей среды до  $260^{\circ}\text{C}$ . Камеры весов и печи во время работы продували потоком азота. Репрезентативная TGA кривая Формы I показана на Фиг. 3. Наблюдали потерю массы примерно  $3,4\%$  от  $27^{\circ}\text{C}$  до  $100^{\circ}\text{C}$ , что соответствует дегидратации моногидратной формы.

#### **Пример 8: Оценка методом динамической сорбции влаги**

Измерение методом динамической сорбции влаги (DMS) осуществляли с использованием атмосферных микровесов VTI, системы SGA-100 (VTI Corp., Nialeah, FL 33016). Использовали взвешенный образец, а влажность была минимально возможной (близкой к  $0\%$  относительной влажности) в начале анализа. Анализ DMS состоял из начальной стадии сушки (относительная влажность  $\sim 0\%$ ) в течение 16 часов, за которой следовали два цикла сорбции и десорбции со скоростью сканирования  $5\%$  относительной

влажности/шаг в диапазоне влажности от 5% до 90% относительной влажности. Анализ DMS осуществляли изотермически при 25°C. Репрезентативная DMS кривая для формы I показана на Фиг. 4.

### Пример 9: Рентгеновская дифракция на монокристалле

Кристалл кристаллогидрата соединения **1** (Форма I) размером 0,28×0,11×0,02 мм закрепляли на стекловолоске.

Данные собирали на дифрактометре Rigaku Atlas CCD, оснащенный охлаждающим устройством Oxford Cryosystems Cobra. Данные собирали с использованием излучения Cu K $\alpha$ , а кристаллическая структура была решена и уточнена с использованием программного обеспечения Bruker AXS SHELXTL. Атомы водорода, присоединенные к углероду, располагались геометрически и позволяли уточнить параметр изотропного смещения в модели "наездника". Атомы водорода, присоединенные к гетероатомам, были расположены на разностной карте Фурье, и их можно было свободно уточнять с использованием параметра изотропного смещения. Параметры элементарной ячейки, а также детали кристаллической системы и пространственной группы представлены в Таблице 2. Данные подтвердили, что форма I является моногидратом.

Таблица 2

#### Данные анализа рентгеновской дифракции монокристаллов

Температура сбора данных	100(2) К
Длина волны, используемая для сбора данных	1,54178 Å
Кристаллическая система	моноклинная
Пространственная группа	C2
Размеры элементарной ячейки	a=20,8736(5) Å
	b=9,15021(19) Å
	c=15,7412(3) Å
	a=90°
	b=98,4786(18)°
	g=90°
Объем элементарной ячейки	2973,67(11) Å <sup>3</sup>
Окончательные R индексы [F <sup>2</sup> > 2σ(F <sup>2</sup> )]	R <sub>1</sub> =0,0368, wR <sub>2</sub> =0,0975

### Пример 10: Исследование стабильности

Образцы Формы I, хранившиеся в условиях ускоренного старения при 25°C и относительной влажности (RH), а также в условиях ускоренного старения 40°C и 75% относительной влажности (RH), анализировали методом ВЭЖХ на содержание соединения **1** и профиль примесей, как показано в Таблицах 3 и 4.

RRT=относительное время удерживания (относительно соединения **1**)

LOQ=предел количественного определения (0,05% a/a), представлены только пики

при или выше LOQ

Таблица 3

**Процентное содержание соединения 1 и примесей при 40°C/75% RH**

	T=0	T=1 месяц 40°C/75% RH	T=3 месяца 40°C/75% RH
RRT	% a/a	% a/a	% a/a
0,77	0,17	0,18	0,18
0,84	0,05	0,06	0,05
0,95			0,05
0,97	0,06	0,07	0,07
<b>Соединение 1</b>	<b>97,5%</b>	<b>97,5%</b>	<b>97,5%</b>
1,10		0,09	
1,11	0,07	0,12	0,10
1,13			0,05
1,18			0,06
1,25	0,11	0,11	0,14
1,28	0,36	0,35	0,36
1,30	0,21	0,23	0,22
1,35	0,06	0,07	0,11
1,77		0,05	
1,84	0,32	0,32	0,31
1,85	0,13	0,14	0,20
2,11	0,06	0,05	0,05
2,27	0,07	0,09	0,07

Таблица 4

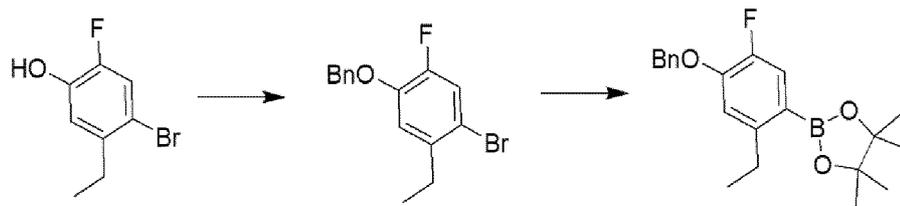
**Процентное содержание соединения 1 и примесей при 25°C/60% RH**

	T=0	T=3 месяца 25°C/60% RH
RRT	% a/a	% a/a
0,77	0,17	0,18
0,84	0,05	0,05
0,95		0,05
0,97	0,06	0,06
<b>Соединение 1</b>	<b>97,5%</b>	<b>97,6%</b>
1,11	0,07	0,08
1,25	0,11	0,14
1,28	0,36	0,36
1,30	0,21	0,22
1,35	0,06	0,10
1,84	0,32	0,31
1,85	0,13	0,20
2,11	0,06	0,06
2,27	0,07	0,07

Форма I показала хорошую стабильность в этих условиях.

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

## диоксаборолан



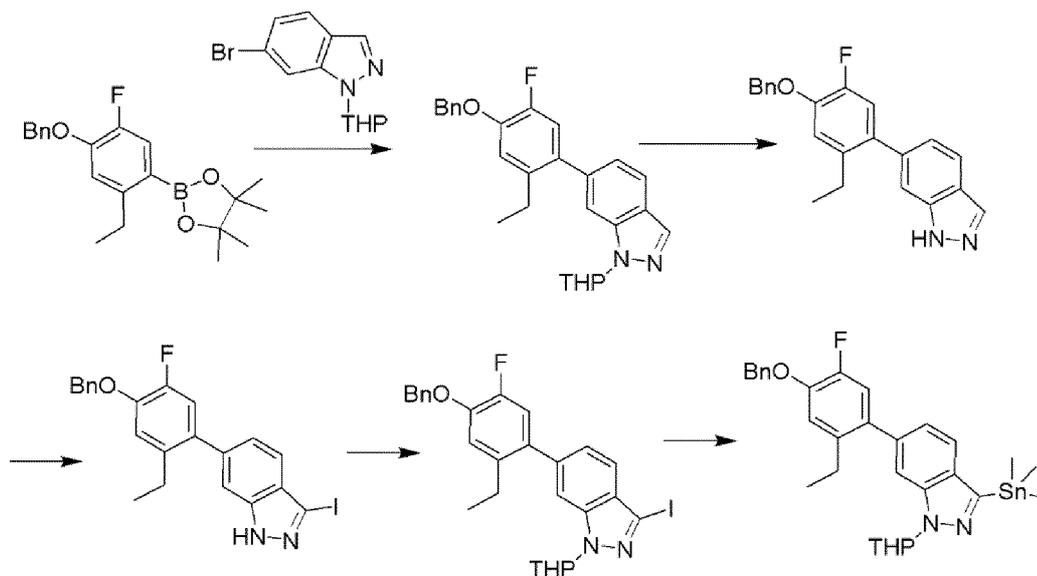
## (а) 1-(Бензилокси)-4-бром-5-этил-2-фторбензол

К раствору 4-бром-5-этил-2-фторфенола (20 г, 91,032 ммоль) в ACN (250 мл) добавляли  $K_2CO_3$  (31,55 г, 228,3 ммоль), затем добавляли по каплям бензилбромид (13,10 мл, 109,58 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивали при  $80^\circ C$  в течение 2 часов. Водный слой экстрагировали при помощи EtOAc (три раза), объединяли и промывали насыщенным солевым раствором. Органический слой сушили над  $Na_2SO_4$  и упаривали при пониженном давлении с получением указанного в заголовке промежуточного соединения в виде бледно-желтой маслянистой жидкости (25 г, 89% выход).  $^1H$  ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d)  $\delta$  7,48-7,30 (м, 5H), 7,27 (д,  $J=10,5$  Гц, 1H), 6,87 (д,  $J=8,7$  Гц, 1H), 5,12 (с, 2H), 2,66 (кв,  $J=7,5$  Гц, 2H), 1,16 (т,  $J=7,5$  Гц, 3H).

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

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

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



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

К раствору 6-бром-1-(тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-1H-индазола (50 г, 178,57 ммоль) и 2-(4-(бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолана (76,3 г, 214,29 ммоль) в смеси DMF:H<sub>2</sub>O (480:120 мл) добавляли K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (94,64 г, 446,86 ммоль). Реакционную смесь дегазировали азотом в течение 15 мин, затем добавляли катализатор Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6,26 г, 8,93 ммоль) и смесь снова дегазировали азотом в течение 5 мин, перемешивали и нагревали при 100-110°C в течение 5 часов. Реакционную смесь фильтровали через целит и остаток промывали EtOAc. Фильтрат разбавляли при помощи EtOAc, промывали холодной водой и насыщенным солевым раствором, сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме с получением неочищенного продукта, который очищали колоночной флэш-хроматографией с получением указанного в заголовке промежуточного соединения в виде белого твердого вещества (65 г, 86% выход). (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчитано для C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 431,21 найдено 431,46. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ 8,06-7,98 (м, 2H), 7,70 (д, J=8,2 Гц, 1H), 7,51-7,32 (м, 5H), 7,08 (дд, J=809,6, 8,3 Гц, 1H), 7,03 (д, J=11,9 Гц, 1H), 6,95 (д, J=8,5 Гц, 1H), 5,76-5,64 (м, 1H), 5,20 (с, 2H), 4,04 (д, J=10,1 Гц, 1H), 3,72 (т, J=9,7 Гц, 1H), 2,52 (кв, J=7,5 Гц, 2H), 2,22-2,02 (м, 3H), 1,80-1,71 (м, 3H), 1,06 (т, J=7,5 Гц, 3H).

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

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

$J=8,4$  Гц, 1H), 5,21 (с, 2H), 2,53 (кв,  $J=7,5$  Гц, 2H), 1,05 (т,  $J=7,5$  Гц, 3H).

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

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

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

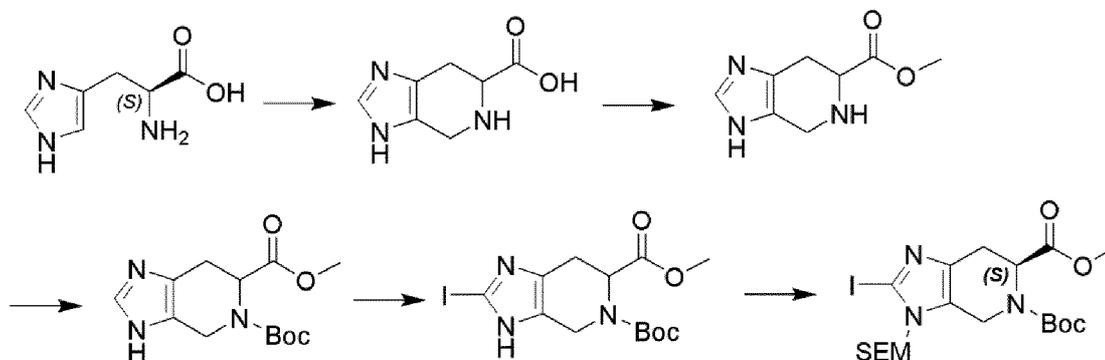
К охлажденному льдом раствору продукта с предыдущей стадии (60 г, 127,12 ммоль) в DCM (700 мл) по каплям добавляли *n*-толуолсульфоновую кислоту (4,84 г, 25,423 ммоль), а затем добавляли 3,4-дигидро-2H-пиран (17,43 мл, 190,68 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, разбавляли при помощи DCM и промывали насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub> и насыщенным солевым раствором. Органический слой сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали флэш-хроматографией (силикагель) с получением указанного в заголовке промежуточного соединения в виде не совсем белого твердого вещества (64 г, выход 91%). (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчитано для C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>FIN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 557,10 найдено 557,30. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ 7,56-7,31 (м, 7H), 7,14 (д,  $J=8,3$  Гц, 1H), 7,01 (д,  $J=11,8$  Гц, 1H), 6,95 (д,  $J=8,5$  Гц, 1H), 5,68 (д,  $J=9,3$  Гц, 1H), 5,20 (с, 2H), 4,08-3,99 (м, 1H), 3,77-3,64 (м, 1H), 2,50 (кв,  $J=7,2$  Гц, 2H), 2,23-1,97 (м, 3H), 1,81-1,68 (м, 3H), 1,06 (т,  $J=7,4$  Гц, 3H).

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

К раствору 6-(4-(бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-3-йод-1-(тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-1H-индазола (20 г, 35,97 ммоль) в толуоле (150 мл) добавляли гексаметилдиолово (9,2 мл, 43,17 ммоль). Реакционную смесь дегазировали азотом в течение 20 мин, затем добавляли тетракис (2,0 г, 1,80 ммоль) и затем перемешивали при 100°C в течение 2 часов, охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через целит и остаток промывали EtOAc. Фильтрат концентрировали и очищали колоночной хроматографией (над нейтральным оксидом алюминия), элюируя смесью 2-5% EtOAc:гексан, с получением указанного в заголовке соединения (17,50 г, выход 82%). (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчитано для C<sub>30</sub>H<sub>35</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Sn 595,17, 593,17 найдено 595,49, 593,55. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ

7,68 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,57-7,29 (м, 6H), 7,13-7,00 (м, 2H), 6,96 (д, J=8,4 Гц, 1H), 5,81-5,68 (м, 1H), 5,21 (с, 2H), 4,13-4,00 (м, 1H), 3,81-3,66 (м, 1H), 2,54 (кв, J=7,3 Гц, 2H), 2,23-2,00 (м, 2H), 1,87-1,59 (м, 4H), 1,08 (т, J=7,5 Гц, 3H), 0,47 (с, 9H).

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



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

К перемешиваемой суспензии L-гистидина (50 г, 322,24 ммоль) в воде (420 мл) по каплям добавляли конц. HCl (29 мл) при 0°C, затем добавляли формальдегид (55 мл, 676,72 ммоль) одной порцией при 0°C. Полученную реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут и затем нагревали при 75°C в течение 6 часов и концентрировали. Полученное неочищенное вещество перемешивали в течение 2 часов с диэтиловым эфиром, фильтровали и промывали смесью IPA:THF (100:300 мл) с получением соли HCl указанного в заголовке промежуточного соединения в виде не совсем белого твердого вещества (75 г, выход 99% (неочищенное)). (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчитано для C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 168,07 найдено 168,17.

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

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

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

К перемешиваемому раствору продукта с предыдущей стадии (80,0 г, 314,96 ммоль) в метаноле (1000 мл) добавляли DIPEA (282 мл, 1574 ммоль), затем ди-трет-бутилдикарбонат (172 мл, 787,48 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при

комнатной температуре в течение 16 часов и затем добавляли жидкий  $\text{NH}_3$  (150 мл, 25% в воде) и реакционную смесь снова перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре, метанол удаляли дистилляцией и остаток экстрагировали в DCM ( $3 \times 200$  мл). Объединенные органические экстракты сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , концентрировали и очищали флэш-хроматографией (силикагель 100-200 меш), элюируя смесью 5%  $\text{MeOH}:\text{DCM}$ , с получением указанного в заголовке промежуточного соединения (41 г, выход 46%). (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  рассчитано для  $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$  282,14 найдено 282,21.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  11,85 (с, 1H), 7,50 (с, 1H), 5,18 (дд,  $J=49,3, 5,1$  Гц, 1H), 4,51 (т,  $J=14,2$  Гц, 1H), 4,09 (дд,  $J=43,9, 16,1$  Гц, 1H), 3,59 (с, 3H), 3,08 (д,  $J=15,5$  Гц, 1H), 2,94 (д,  $J=15,1$  Гц, 1H), 1,45 (с, 9H).

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

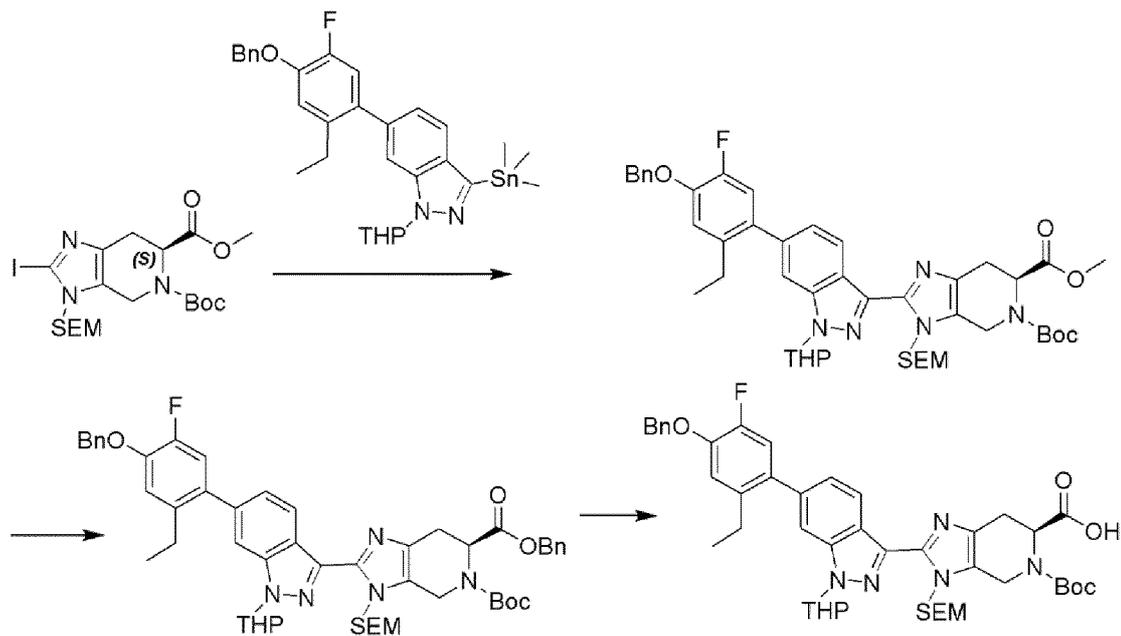
К раствору продукта с предыдущей стадии (41,0 г, 145,9 ммоль) в THF (500 мл) добавляли N-йодсукцинимид (66,0 г, 291,8 ммоль) при  $0^\circ\text{C}$  и полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов, разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом. Органическую часть промывали 10% раствором тиосульфата натрия ( $3 \times 200$  мл). Объединенный органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением 60 г указанного в заголовке соединения (неочищенное), которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  рассчитано для  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{IN}_3\text{O}_4$  408,03 найдено 408,31.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  12,48 (с, 1H), 5,34-4,97 (м, 1H), 4,67-4,35 (м, 1H), 4,12-3,95 (м, 1H), 3,60 (с, 3H), 3,14-2,82 (м, 2H), 1,44 (с, 9H).

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

К перемешиваемому раствору 5-(*трет-бутил*) 6-метил (S)-2-йод-3,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5,6-дикарбоксилата (40 г, 0,098 моль) в DMF (150 мл) добавляли DIPEA (35,1 мл, 0,19 моль) при  $0^\circ\text{C}$ . Реакционную смесь перемешивали в течение 10 мин, затем добавляли по каплям 2-(триметилсилил)-этоксиметилхлорид (19,1 мл, 0,10 моль) при  $0^\circ\text{C}$ . Полученную реакционную смесь перемешивали в течение 3 часов при комнатной температуре. Через 4 часа добавляли охлажденную воду и реакционную смесь экстрагировали при помощи  $\text{EtOAc}$  ( $2 \times 200$  мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, концентрировали и очищали колоночной флэш-хроматографией, элюируя смесью 20-35%  $\text{EtOAc}:\text{гексан}$ , с получением указанного в заголовке продукта в виде бледно-желтой вязкой жидкости (27 г). (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  рассчитано для  $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{IN}_3\text{O}_5\text{Si}$  538,12 найдено 538,42.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  5,33-5,04 (м, 3H), 4,79-4,56 (м, 1H), 4,54-4,14 (м, 1H), 3,60 (с, 3H), 3,47 (т,  $J=7,8$  Гц, 2H), 3,31-3,16 (м, 1H), 2,97 (т,  $J=18,9$  Гц, 1H), 1,44 (с, 9H), 0,92-0,74 (м, 2H), -0,03 (с, 9H).

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

**карбоновая кислота**



(а) 5-(*трет*-бутил) 6-метил (6*S*)-2-(6-(4-(бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-1-(тетрагидро-2*H*-пиран-2-ил)-1*H*-индазол-3-ил)-3-((2-(триметилсилил)этокси)метил)-3,4,6,7-тетрагидро-5*H*-имидазо[4,5-*c*]пиридин-5,6-дикарбоксилат

К перемешиваемому раствору 5-(*трет*-бутил) 6-метил (*S*)-2-йод-3-((2-триметилсилил)этокси)метил)-3,4,6,7-тетрагидро-5*H*-имидазо[4,5-*c*]пиридин-5,6-дикарбоксилата (17,0 г, 31,65 ммоль) в толуоле (500 мл) добавляли 6-(4-(бензилокси)-2-этил-5-фторфенил)-1-(тетрагидро-2*H*-пиран-2-ил)-3-(триметилстаннил)-1*H*-индазол (20 г, 34,82 ммоль). Реакционную смесь продували аргоном в течение 15 мин, добавляли Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (3,6 г, 3,16 ммоль) и йодид меди (1,20 г, 6,33 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при 120°C в течение 16 часов. Реакционную смесь фильтровали через целит, фильтрат концентрировали при пониженном давлении и очищали колоночной хроматографией на силикагеле (колонка Redisep 80 г, элюирование DCM в течение 10 мин, затем 15-20% EtOAc в гексане с получением указанного в заголовке промежуточного соединения в виде желтого твердого вещества (15,10 г, выход 58%). (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> рассчитано для C<sub>46</sub>H<sub>58</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Si 840,41 найдено 840,54. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-*d*) δ 8,43 (с, 1*H*), 7,54-7,33 (м, 6*H*), 7,20 (с, 1*H*), 7,05 (д, J=11,4 Гц, 1*H*), 6,95 (д, J=8,5 Гц, 1*H*), 6,09-5,69 (м, 3*H*), 5,59-5,36 (м, 1*H*), 5,20 (с, 2*H*), 4,97-4,80 (м, 1*H*), 4,12-3,90 (м, 1*H*), 3,68 (с, 3*H*), 3,57-3,47 (м, 2*H*), 3,40 (д, 1*H*), 3,21-3,05 (м, 1*H*), 2,74-2,34 (м, 4*H*), 2,25-2,07 (м, 2*H*), 1,94-1,65 (м, 4*H*), 1,54 (с, 9*H*), 1,12-0,99 (м, 3*H*), 0,91-0,75 (м, 2*H*), -0,12 (с, 9*H*).

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

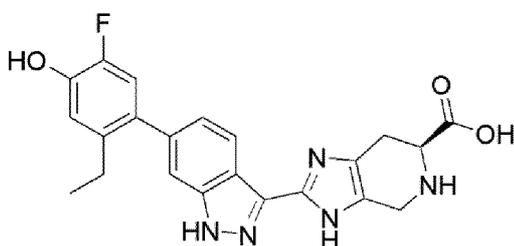
В круглодонную колбу добавляли продукт с предыдущей стадии (15,0 г, 17,85 ммоль) в толуоле (400 мл), бензиловый спирт (46,3 мл) и Ti(OEt)<sub>4</sub> (7,15 мл, 35,70 ммоль) и

реакционную смесь интенсивно кипятили с обратным холодильником (140°C) в течение 48 часов, разбавляли водой и экстрагировали при помощи DCM. Суспензию фильтровали, фильтрат сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, концентрировали при пониженном давлении и очищали колоночной хроматографией на силикагеле (колонка Redisep 80 г, 0-5% EtOAc в гексане) в течение 20 минут для удаления избытка бензилового спирта, затем элюировали смесью 10-15% EtOAc в гексане) с получением указанного в заголовке промежуточного соединения. <sup>1</sup>H ЯМР соответствует структуре. (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчитано для C<sub>52</sub>H<sub>62</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Si 916,44 найдено 916,86.

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

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

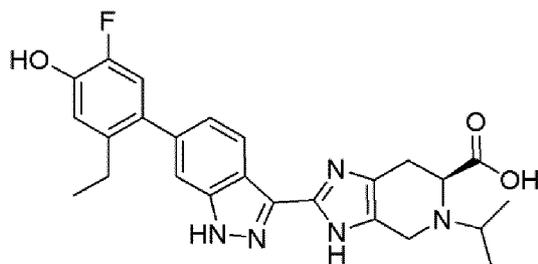
**Получение 12: (S)-2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновая кислота**



К перемешиваемому раствору (6S)-5-(*трет*-бутоксикарбонил)-2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1-(тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-1H-индазол-3-ил)-3-((2-(триметилсилил)этокси)-метил)-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновой кислоты (5,7 г, 7,75 ммоль) в смеси 5:1 диоксан:вода (60 мл) добавляли конц. HCl (20 мл) по каплям при 0°C. Реакционную смесь нагревали и перемешивали при 90°C в течение 16 часов и подвергали вакуумной дистилляции с получением неочищенного остатка, который последовательно растирали в порошок с охлажденным диэтиловым

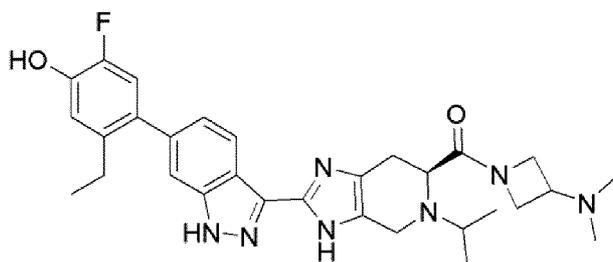
эфиром и ацетонитрилом с получением соли HCl указанного в заголовке соединения (3,6 г, выход 95%) в виде светло-коричневого твердого вещества. (m/z): [M+H]<sup>+</sup> рассчитано для C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>3</sub> 422,16 найдено 422,24. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, D<sub>2</sub>O/DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,22 (д, J=8,4 Гц, 1H), 7,49 (с, 1H), 7,19 (д, J=8,1 Гц, 1H), 6,99 (д, J=11,9 Гц, 1H), 6,91 (д, J=9,0 Гц, 1H), 4,56-4,51 (м, 1H), 4,36 (д, J=15,5 Гц, 1H), 4,30 (д, J=15,5 Гц, 1H), 3,35-3,25 (м, 1H), 3,15-3,05 (м, 1H), 2,4-2,55 (м, 2H), 0,97 (т, J=7,5 Гц, 3H).

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



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

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



C-1

К раствору (S)-2-(6-(2-этил-5-фтор-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-с]пиридин-6-карбоновой кислоты, TFA (179 мг, 0,310 ммоль), N, N-диметилазетидин-3-амин, 2 HCl (107 мг, 0,465 ммоль), и DIPEA (0,162 мл, 0,930 ммоль) в DMF (4 мл) добавляли HATU (177 мг, 0,465 ммоль) и реакцию перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Добавляли гидразин (5 экв.), реакцию перемешивали и очищали препаративной ВЭЖХ с получением соли TFA указанного в заголовке соединения (63 мг, выход 26%). (m/z):

$[M+H]^+$  рассчитано для  $C_{30}H_{36}FN_7O_2$  546,29 найдено 546,7.  $^1H$  ЯМР (400 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,90 (с, 1H), 8,29 (дд, 1H), 7,34 (с, 1H), 7,07 (д, 1H), 7,01 (д, 1H), 6,89 (д, 1H), 4,35-4,18 (м, 1H), 4,11-3,94 (м, 1H), 3,94-3,73 (м, 3H), 3,70-3,57 (м, 2H), 3,06-2,94 (м, 2H), 2,87-2,66 (м, 2H), 2,48-2,40 (м, 2H), 2,13-2,00 (м, 6H), 1,07 (т, 3H), 1,03-0,93 (м, 6H).

#### Биологические анализы

Соединение **1** было охарактеризовано в следующих биологических анализах.

#### **Анализ 1: Биохимические анализы киназы JAK**

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

Серийно разведенные соединения предварительно инкубировали с каждым из четырех JAK ферментов и субстратом в белых 384-луночных микропланшетах (Corning) при температуре окружающей среды в течение 1 часа. Затем для инициирования киназных реакций добавляли АТФ в общем объеме 10 мкл с 1% DMSO. Конечные концентрации фермента для JAK1, 2, 3 и Tyk2 составляли 4,2 нМ, 0,1 нМ, 1 нМ и 0,25 нМ, соответственно; соответствующие используемые концентрации  $K_m$  АТФ составляли 25 мкМ, 3 мкМ, 1,6 мкМ и 10 мкМ; при этом концентрация субстрата составляла 200 нМ для всех четырех анализов. Киназным реакциям давали осуществиться в течение 1 часа при температуре окружающей среды перед добавлением 10 мкл препарата EDTA (конечная концентрация 10 мМ) и Tb-анти-pSTAT1 (pTyr701) антитела (Life Technologies, конечная концентрация 2 нМ) в буфере для разведения TR-FRET (Life Technologies). Планшеты инкубировали при температуре окружающей среды в течение 1 часа перед считыванием на ридере EnVision (Perkin Elmer). Отношения сигналов эмиссии (520 нм/495 нм) регистрировали и использовали для расчета процента ингибирования на основании DMSO и фоновых контролей.

Для анализа доза-ответ данные ингибирования в процентах наносили на график в зависимости от концентрации соединения, а значения  $IC_{50}$  определяли из 4-параметрической робастной модели подбора с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad Software). Результаты выражали как  $pIC_{50}$  (отрицательный логарифм  $IC_{50}$ ) и затем преобразовывали в  $pK_i$  (отрицательный логарифм константы диссоциации,  $K_i$ ) с использованием уравнения Ченга-Пруссоффа.

Испытываемые соединения, имеющие более низкое значение  $K_i$  или более высокое значение  $pK_i$  в четырех анализах JAK, демонстрируют большее ингибирование активности JAK.

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

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

JAK1/3.

Фосфорилированный STAT5 измеряли с использованием набора AlphaLISA SureFire Ultra pSTAT5 (Tyr694/699) (PerkinElmer). Т-клетки человека из клеточной линии Tall-1 культивировали в увлажненном инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в RPMI (Life Technologies), дополненной 15% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой (FBS, Life Technologies), 2 mM Glutamax (Life Technologies), 25 mM HEPES (Life Technologies) и 1X пенициллина/стрептомицина (Life Technologies). Соединения серийно разбавляли в DMSO и акустически распределяли в пустые лунки. Среду для анализа (DMEM без фенолового красного (Life Technologies), дополненную 10% FBS (ATCC)) распределяли (4 мкл/лунка) и планшеты встряхивали при 900 об/мин в течение 10 минут. Клетки высевали по 45000 клеток/лунка в среду для анализа (4 мкл/лунка) и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 1 часа, с последующим добавлением IL-2 (R&D Systems; конечная концентрация 300 нг/мл) в предварительно подогретой среде для анализа (4 мкл) в течение 30 минут. После стимуляции цитокинами клетки лизировали при помощи 6 мкл 3× буфера для лизиса AlphaLisa (PerkinElmer), содержащего 1× таблетки PhosStop и Complete (Roche). Лизат встряхивали при 900 об/мин в течение 10 минут при комнатной температуре (комн.темп.). Фосфорилированный STAT5 измеряли с использованием набора pSTAT5 AlphaLisa (PerkinElmer). Свежеприготовленную смесь акцепторных гранул наносили на лизат (5 мкл) при мощности прошедшего через зеленый светофильтр света <100 люкс. Планшеты встряхивали при 900 об/мин в течение 2 минут, быстро центрифугировали и инкубировали в течение 2 часов при комн. темп. в темноте. Акцепторные гранулы распределяли (5 мкл) при мощности прошедшего через зеленый светофильтр света <100 люкс. Планшеты встряхивали при 900 об/мин в течение 2 минут, быстро центрифугировали и инкубировали в течение ночи при комн. темп. в темноте. Люминесценцию измеряли с возбуждением при 689 нм и эмиссии при 570 нм с использованием планшет-ридера EnVision (PerkinElmer) при мощности прошедшего через зеленый светофильтр света <100 люкс.

Для определения ингибирующей активности испытываемых соединений в ответ на IL-2 измеряли среднюю интенсивность эмиссии гранул, связанных с pSTAT5, в линии Т-клеток человека. Значения IC<sub>50</sub> определяли из анализа кривых ингибирования интенсивности сигнала в зависимости от концентрации соединения. Данные выражены в виде значений pIC<sub>50</sub> (отрицательный десятичный логарифм IC<sub>50</sub>) (среднее значение ± стандартное отклонение).

#### Результаты анализа in vitro

**Таблица 5**

Соединение	JAK1 pK <sub>i</sub>	JAK2 pK <sub>i</sub>	JAK3 pK <sub>i</sub>	Тук2 pK <sub>i</sub>	Tall-1 pIC <sub>50</sub>
<b>1</b>	10,2	10,5	10,2	9,1	8,6
<b>С-1</b>	10,4	10,8	10,1	9,5	8,8

**Анализ 3: Мышиная модель IL-13-индуцированной индукции pSTAT6 в**

### легочной ткани

IL-13 является важным цитокином, лежащим в основе патофизиологии астмы (Kudlacz et al. Eur. J. Pharmacol, **2008**, 582,154-161). IL-13 связывается с рецепторами клеточной поверхности, активирующими членов семейства киназ Janus (JAK), которые затем фосфорилируют STAT6, а затем активируют дальнейшие пути транскрипции. В описанной модели дозу IL-13 доставляли локально в легкие мышей, чтобы вызвать фосфорилирование STAT6 (pSTAT6), которое затем измеряли как конечную точку.

В анализе использовали взрослых мышей Balb/c от Harlan. В день исследования животных слегка анестезировали изофлураном и вводили либо носитель, либо испытываемое соединение (1 мг/мл, общий объем 50 мкл за несколько вдохов) посредством пероральной аспирации. После введения дозы животных помещали в лежачее положение на боку и наблюдали за полным восстановлением после анестезии перед возвращением в свою клетку. Четыре часа спустя животных снова подвергали кратковременной анестезии и заражали либо носителем, либо IL-13 (общая доставляемая доза 0,03 мкг, общий объем 50 мкл) посредством пероральной аспирации, затем отслеживали на восстановление после анестезии и возвращали в клетку. Через один час после введения носителя или IL-13 собирали цельную кровь и легкие как для определения pSTAT6 в гомогенатах легких с использованием набора для анализа Perkin Elmer AlphaLISA® SureFire® Ultra™ HV p-STAT6 (Tyr641), так и для анализа общей концентрации лекарственного средства как в легких, так и в плазме. Образцы крови центрифугировали (центрифуга Eppendorf, 5804R) в течение 4 минут при приблизительно 12000 об/мин при 4°C для сбора плазмы. Легкие промывали в DPBS (фосфатно-солевой буфер Дульбекко), сушили, быстро замораживали, взвешивали и гомогенизировали при разведении 1:3 в 0,1% муравьиной кислоте в воде для ВЭЖХ. Уровни испытываемого соединения в плазме и легких определяли анализом ЖХ-МС относительно аналитических стандартов, построенных на стандартной кривой в тестовой матрице. Отношение уровней в легких к уровням в плазме определяли как отношение концентрации в легких в нг/г к концентрации в плазме в нг/мл через 5 часов.

Об активности в модели свидетельствует снижение уровня pSTAT6, присутствующего в легких обработанных животных через 5 часов, по сравнению с контрольными животными, обработанными носителем и стимулированными IL-13. Разница между контрольными животными, обработанными носителем, стимулированными IL-13, и контрольными животными, обработанными носителем, стимулированными носителем, диктовала 0% и 100% ингибирующий эффект, соответственно, в любом данном эксперименте. Соединение **1** продемонстрировало ингибирование фосфорилирования STAT6 через 5 часов после IL-13-стимуляции, как показано ниже.

Таблица 6

#### Наблюдаемое ингибирование pSTAT6 и экспозиция в плазме/легких

Соединение	Концентрация в легких (нг/г)	Концентрация в плазме	Отношение легкие/плазма	Ингибирование pSTAT6 через 5
------------	------------------------------	-----------------------	-------------------------	------------------------------

	через 5 часов	(нг/мл) через 5 часов	через 5 часов	часов
<b>1</b>	10155±1979	24,0±16,2	423	75

Наблюдаемая значительная концентрация соединения в легком мыши подтвердила, что наблюдаемое ингибирование IL-13-индуцированной индукции pSTAT6 было результатом активности испытываемого соединения. Отношение легкие/плазма через 5 часов показало, что соединение **1** имело значительно большую экспозицию в легких мышей, чем экспозицию в плазме.

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

Тимический стромальный лимфопоэтин (TSLP) и регулируемый тимусом и активацией хемокин (TARC) сверхэкспрессируются в астматических дыхательных путях и коррелируют с тяжестью заболевания. В легких TSLP может высвобождаться клетками бронхиального эпителия в ответ на аллергены и вирусные инфекции. Сигналы TSLP передаются через гетеродимер IL-7R $\alpha$ /TSLPR, присутствующий в широком ряде тканей и типов клеток, включая эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, нейтрофилы, макрофаги и тучные клетки. Связывание TSLP с его рецептором вызывает конформационные изменения, которые активируют JAK1 и JAK2 для фосфорилирования различных факторов транскрипции, включая STAT3 и STAT5. В иммунных клетках это запускает каскад внутриклеточных событий, которые приводят к клеточной пролиферации, антиаптозу, миграции дендритных клеток и продукции цитокинов и хемокинов Th2. В мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) TSLP имеет провоспалительный эффект, активируя миелоидные дендритные клетки для привлечения и стимуляции T-клеток, процесс, опосредованный хемоаттрактантом TARC.

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

Аликвоты PBMC (предварительно выделенные из цельной крови и замороженные аликвотами при -80°C) от 3-5 доноров размораживали при 37°C и по каплям добавляли к 40 мл предварительно нагретой, стерильно отфильтрованной полной среды RPMI в 50-мл пробирки Falcon. Клетки осаждали и ресуспендировали в полной среде при концентрации  $2,24 \times 10^6$  клеток/мл. Клетки высевали по 85 мкл (190000 клеток) на лунку в 96-луночный микропланшет с плоским дном, обработанный тканевой культурой. Клетки оставляли в состоянии покоя в течение 1 часа при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>.

Соединения получали в виде 10 мМ исходных растворов в DMSO. Осуществляли 3,7-кратные серийные разведения для получения 9 концентраций испытываемого соединения в DMSO при 300X конечной испытываемой концентрации. 150-кратные промежуточные разведения осуществляли в полных средах для получения соединения при 2X конечной испытываемой концентрации с 0,2% DMSO. После периода покоя в течение 1 часа в каждую лунку с PBMC добавляли 95 мкл 2X соединения для получения

конечного диапазона концентраций от 33,33 мкМ до 0,95 мкМ. В необработанные контрольные лунки добавляли 95 мкл 0,2% DMSO в полной среде. Клетки предварительно обрабатывали соединением в течение 1 часа при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> перед стимуляцией.

Рекомбинантный человеческий белок TSLP восстанавливали при 10 мкг/мл в стерильной DPBS с 0,1% BSA и хранили аликвотами при -20°C. Непосредственно перед использованием аликвоту размораживали и подготавливали при 20X конечной испытываемой концентрации в полной среде. 10 мкл 20X TSLP добавляли в каждую лунку с РВМС до конечной испытываемой концентрации 10 нг/мл. В нестимулированные контрольные лунки добавляли 10 мкл полной среды. Клетки стимулировали в присутствии соединения в течение 48 часов при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>.

После стимуляции собирали супернатанты клеточных культур и определяли уровни TARC при помощи твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием набора Human CCL17/TARC Quantikine ELISA (R&D Systems #DDN00) в соответствии с инструкциями изготовителя.

Для анализа доза-ответ логарифм [испытываемое соединение (M)] наносили на график против процентных значений ответа для каждого донора, а значения IC<sub>50</sub> определяли с использованием нелинейного регрессионного анализа при помощи программного обеспечения GraphPad Prism с использованием 4-параметрического сигмоидального алгоритма доза-ответ с переменным углом наклона. Данные выражали в виде средних значений pIC<sub>50</sub> (отрицательный десятичный логарифм IC<sub>50</sub>), рассчитанных из значений pIC<sub>50</sub> отдельных доноров и округленных до одного десятичного знака. Значения эффективности ингибирования исходными соединениями и их де-фтор-модифицированными аналогами приведены в Таблице 7.

**Таблица 7**

**Значения активности (pIC<sub>50</sub>) испытываемых соединений для ингибирования TSLP-вызванного высвобождения TARC в мононуклеарных клетках периферической крови человека**

Соединение	pIC <sub>50</sub> ± ст. откл.
<b>1</b>	7,2 ± 0,1
<b>C-1</b>	7,0 ± 0,1

#### **Анализ 5: Метаболизм в S9 легких**

Метаболическую стабильность *in vitro* соединений **1** и **C-1** оценивали во фракции S9 легких человека (1 мкМ соединения; 1 мг/мл белка S9). Образцы, взятые в моменты времени 0, 15, 30 и 60 минут, анализировали на исходное соединение методом ЖХ-МС/МС с высоким разрешением. Фракции S9 легких человека (партия 1410245) приобретали у Xenotech LLC (Lenexa, KS). NADPH (Sigma Aldrich, N1630) и 3-фосфоаденозин-5-фосфосульфат (PAPS) (Sigma Aldrich, A1651) приобретали у Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Ацетонитрил и воду получали от VWR (Radnor, PA), и они имели степень чистоты для ВЭЖХ или выше. Ралоксифен и муравьиную кислоту приобретали у Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Инкубацию легочного S9 осуществляли на водяной бане

при 37°C в 96-луночном полипропиленовом планшете. Растворы S9 лerb[ состояли из 100 мМ фосфата калия, забуференного до pH 7,4 (BD Biosciences, Woburn, MA), дополненного 1 мМ NADPH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 3 мМ хлорида магния (Sigma Aldrich, M1028), и в присутствии 100 мкМ кофактора PAPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), с конечными инкубационными концентрациями белка 1 мг/мл. 10 мМ исходные растворы ралоксифена (n=1) и соединения (n=1) в DMSO разводили в буфере и добавляли в инкубационные смеси для получения концентраций субстрата 1 мкМ (0,001% DMSO об/об). Инкубационные объемы составляли 400 мкл, и были выбраны моменты времени через 0, 15, 30 и 60 минут для отбора 70-мкл аликвоты и разведения в 140 мкл ацетонитрила (0% муравьиной кислоты). Все образцы центрифугировали при 2250 g в течение 10 минут при 5°C. Супернатант (50 мкл) брали из центрифугированных образцов и разводили в 100 мкл воды для ВЭЖХ, содержащей внутренний стандарт. Образцы отбирали при помощи автоматического пробоотборника Dionex Ultimate 3000 и анализировали с использованием масс-спектрометра высокого разрешения Thermo Q-Exactive (Thermo, Waltham, MA) в режиме полного сканирования, соединенного с колонкой Atlantis T3 3 мкМ - 2,1×50 мм (Waters Inc., 186003717). Подвижная фаза А состояла из воды+0,2% муравьиной кислоты, а подвижная фаза В состояла из ацетонитрила+0,2% муравьиной кислоты. Интеграцию пиков осуществляли с использованием программного обеспечения Gubbs GMSU (Gubbs Inc., Alpharetta, GA). Для каждого образца отношения площадей пиков рассчитывали путем деления площади пика аналита на площадь пика внутреннего стандарта. Для каждой инкубации отношения площадей пиков аналитов в каждой точке t0 устанавливали как 100%, а отношения площадей пиков для 60-мин образцов преобразовывали в оставшиеся проценты относительно соответствующего времени t0. Определение образования сульфатного метаболита осуществляли способом качественного определения путем наблюдения рано элюирующего пика в исходном ионном канале, который, на основании исторических внутренних данных, соответствовал О-сульфатному метаболиту каждого исходного соединения. Результаты анализа представлены в Таблице 8 (n=2 повтора).

Таблица 8

**Метаболическая стабильность во фракции S9 легких человека**

Соединение	Клиренс (мкл/мин/мг)	Соединение, оставшееся через 60 мин. (%)	Появление сульфата
<b>1</b>	3,5	81	да
<b>C-1</b>	49,0	6	да

По сравнению с соответствующим фторсодержащим аналогом (соединение **C-1**) соединение **1** вызывало значительно меньший сульфатирующий метаболизм.

**Анализ 6: Фармакокинетика в плазме и легких у мышей**

Концентрации испытываемого соединения в плазме и легких и их отношение определяли следующим образом. В анализе использовали мышей BALB/c от Charles River Laboratories. Соединение **1** индивидуально формулировали в 20% пропиленгликоле в pH 4 цитратном буфере в концентрации 0,2 мг/мл, и 50 мкл раствора для дозирования вводили

в трахею мыши путем пероральной аспирации. В различные моменты времени (обычно 0,167, 2, 6, 24 часа) после введения дозы образцы крови брали путем сердечной пункции и у мышей вырезали неповрежденные легкие. Образцы крови центрифугировали (центрифуга Eppendorf, 5804R) в течение 4 минут при приблизительно 12000 об/мин при 4°C для сбора плазмы. Легкие обсушивали, взвешивали и гомогенизировали при разведении 1:3 в стерильной воде. Концентрации тестируемого соединения в плазме и легких определяли анализом ЖХ-МС относительно аналитических стандартов, построенных на стандартной кривой в тестовой матрице. Отношение легкие/плазма определяли как отношение AUC в легких в мкг·ч/г к AUC в плазме в мкг·ч/мл, где AUC обычно определяется как площадь под кривой зависимости концентрации испытуемого соединения от времени.

**Таблица 9**

**Экспозиция в плазме и легочной ткани после однократного перорального аспирационного введения соединения 1**

Соединение	AUC <sub>(0-24)</sub> в плазме (мкг·ч/мл)	AUC <sub>(0-24)</sub> в ткани легких (мкг·ч/г)	Отношение AUC в ткани легких:плазме
<b>1</b>	0,943	54,5	57,8

**Анализ 7: Ингибирование IFN $\gamma$  и IL-27-индуцированных хемокинов CXCL9 и CXCL10 в 3D-культурах дыхательных путей человека**

Культуры тканей EpiAirway получали от Mattek (AIR-100). Культуры были получены от астматических доноров. Во вставке для клеточных культур эпителиальные клетки трахеи/бронхов человека выращивали и дифференцировали на пористой мембранной подложке, обеспечивая границу раздела воздух-жидкость с подогретой культуральной средой под клетками и газообразной атмосферой для испытаний над ними. Ткани культивировали в поддерживающей среде (Mattek, AIR-100-MM) в увлажненном инкубаторе при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. Тестировали четырех доноров. В день 0 культуры тканей обрабатывали испытуемым соединением на поверхности жидкости при 10 мкМ, 1 мкМ и/или 0,1 мкМ. Соединение **1** разбавляли диметилсульфоксидом (DMSO, Sigma) до конечной концентрации 0,1%. DMSO в концентрации 0,1% использовали для контроля в качестве носителя. Соединение **1** инкубировали с культурами в течение 1 часа при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, с последующим добавлением предварительно подогретой среды, содержащей IFN $\gamma$  (R&D Systems) или IL-27 (R&D Systems) в конечной концентрации 100 нг/мл. Культуры тканей сохраняли в течение 8 дней. Среду заменяли каждые 2 дня свежей средой, содержащей Соединение **1** и IFN $\gamma$  или IL-27. На 8-й день для анализа собирали культуры тканей и супернатанты. Образцы супернатантов анализировали на CXCL10 (IP-10) и CXCL9 (MIG) с использованием luminex анализа (EMD Millipore). Данные выражены как % ингибирования +/- стандартное отклонение ( $\pm$ STDV). Процент ингибирования определяли по ингибирующей активности соединения в отношении индуцированной IFN $\gamma$  или IL-27 секреции CXCL10 или CXCL9 по сравнению с клетками, обработанными носителем. Данные являются средними от 4 доноров. Соединение 1 способно ингибировать, индуцированную IFN $\gamma$  секрецию CXCL10

на  $100\% \pm 1,0$  (при 10 мкМ),  $76\% \pm 13$  (при 1 мкМ) и  $18\% \pm 22$  (при 0,1 мкМ) по сравнению с контролем, представляющим собой носитель. Соединение **1** способно ингибировать индуцированную  $IFN\gamma$  секрецию CXCL9 на  $100\% \pm 0,1$  (при 10 мкМ),  $93\% \pm 6,9$  (при 1 мкМ) и  $16\% \pm 41$  (при 0,1 мкМ) по сравнению с носителем. Соединение **1** способно ингибировать индуцированную IL-27 секрецию CXCL10 на  $100\% \pm 0,0$  (при 10 мкМ),  $98\% \pm 1,0$  (при 1 мкМ) и  $25\% \pm 26$  (при 0,1 мкМ) по сравнению с используемым в качестве контроля носителем. Соединение **1** способно ингибировать индуцированную IL-27 секрецию CXCL9 на  $100\% \pm 0,0$  (при 10 мкМ),  $97\% \pm 2,0$  (при 1 мкМ) и  $52\% \pm 18$  (при 0,1 мкМ) по сравнению с используемым в качестве контроля носителем.

#### **Анализ 8: Анализ клеточной активности JAK: Ингибирование $IFN\gamma$ -индуцированного pSTAT1**

Эффективность соединения **1** для ингибирования стимулированного интерфероном гамма ( $IFN\gamma$ ) фосфорилирования STAT1 измеряли в CD14-положительных (CD14+) моноцитах, полученных из цельной крови человека (Stanford Blood Center) с использованием проточной цитометрии. Поскольку  $IFN\gamma$  передает сигналы через JAK, этот анализ обеспечивает показатель клеточной активности JAK.

Моноциты идентифицировали с использованием флуоресцеинизотиоцианат-конъюгированного (FITC) анти-CD14 антитела (Клон RM052, Beckman Coulter) и использовали Alexa Fluor 647-конъюгированное анти-pSTAT1 антитело (pY701, Клон 4a, BD Biosciences) для детекции фосфорилирования STAT1.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли из цельной крови здоровых доноров с использованием градиента фикола. Клетки культивировали в увлажненном инкубаторе при  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  в RPMI (Life Technologies), дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS, Life Technologies), 2 mM Glutamax (Life Technologies), 25 mM HEPES (Life Technologies) и 1X пенициллина/стрептомицина (Life Technologies). Клетки высевали по 250000 клеток/лунка в среду (200 мкл), культивировали в течение 2 часов и повторно суспендировали в среде для анализа (50 мкл) (RPMI, дополненная 0,1% бычьего сывороточного альбумина (Sigma), 2 mM Glutamax, 25 mM HEPES и 1X пенициллина/стрептомицина), содержащей различные концентрации испытываемого соединения. Соединение серийно разбавляли в DMSO и затем разбавляли еще раз 1000-кратно в среде для доведения конечной концентрации DMSO до 0,1%. Разведения испытываемого соединения инкубировали с клетками при  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  в течение 1 часа, с последующим добавлением предварительно нагретого  $IFN\gamma$  (R&D Systems) в среду (50 мкл) в конечной концентрации 0,6 нг/мл в течение 30 мин. После стимуляции цитокинами клетки фиксировали предварительно подогретым фиксирующим раствором (100 мкл) (BD Biosciences) в течение 10 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , промывали дважды буфером FACS (1 мл) (1% BSA в PBS), повторно суспендировали в анти-CD14 FITC:FACS буфере в соотношении 1:10 (100 мкл) и инкубировали при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 15 мин. Клетки промывали один раз и затем повторно суспендировали в охлажденном льдом Perm Buffer III (BD Biosciences) (100 мкл)

в течение 30 мин при 4°C. Клетки промывали дважды буфером FACS и затем повторно суспендировали в анти-pSTAT1 Alexa Fluor 647:FACS буфере 1:10 (100 мкл) в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте, промывали дважды в FACS буфере и анализировали с использованием проточного цитометра MACSQuant (Miltenyi).

Для определения ингибирующей активности испытываемого соединения измеряли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) pSTAT1 в CD14+ моноцитах. Значения IC<sub>50</sub> определяли из анализа кривых ингибирования MFI против концентрации соединения. Данные выражали в виде значений pIC<sub>50</sub> (отрицательный десятичный логарифм IC<sub>50</sub>). Соединение **1** показало значение pIC<sub>50</sub> 7,5 в этом анализе.

#### **Анализ 9: Анализ клеточной активности JAK: Ингибирование GM-CSF-индуцированного pSTAT5**

Эффективность соединения **1** для ингибирования стимулированного гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF) фосфорилирования STAT5 измеряли в CD14-положительных (CD14+) моноцитах, полученных из цельной крови человека (Stanford Blood Center) с использованием проточной цитометрии. Поскольку GM-CSF передает сигналы через JAK, этот анализ обеспечивает показатель клеточной активности JAK.

Моноциты идентифицировали с использованием флуоресцеинизотиоцианат-конъюгированного (FITC) анти-CD14 антитела (Клон RM052, Beckman Coulter) и использовали Alexa Fluor 647-конъюгированное анти-pSTAT5 антитело (pY694, BD Biosciences) для детекции фосфорилирования STAT5.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли из цельной крови здоровых доноров с использованием градиента фиколла. Клетки культивировали в увлажненном инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в RPMI (Life Technologies), дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS, Life Technologies), 2 mM Glutamax (Life Technologies), 25 mM HEPES (Life Technologies) и 1X пенициллина/стрептомицина (Life Technologies). Клетки высевали по 250000 клеток/лунка в среду (200 мкл), культивировали в течение 2 часов и повторно суспендировали в среде для анализа (50 мкл) (RPMI, дополненная 0,1% бычьего сывороточного альбумина (Sigma), 2 mM Glutamax, 25 mM HEPES и 1X пенициллина/стрептомицина), содержащей различные концентрации испытываемого соединения. Соединение серийно разбавляли в DMSO и затем разбавляли еще раз 1000-кратно в среде для доведения конечной концентрации DMSO до 0,1%. Разведения испытываемого соединения инкубировали с клетками при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 1 часа, с последующим добавлением предварительно нагретого GM-CSF (R&D Systems) в среду (50 мкл) в конечной концентрации 0,3 нг/мл в течение 15 мин. После стимуляции цитокинами клетки фиксировали предварительно подогретым фиксирующим раствором (100 мкл) (BD Biosciences) в течение 10 мин при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, промывали дважды буфером FACS (1 мл) (1% BSA в PBS), повторно суспендировали в анти-CD14 FITC:FACS буфере в соотношении 1:10 (100 мкл) и инкубировали при 4°C в течение 15 мин. Клетки промывали

один раз и затем повторно суспендировали в охлажденном льдом Perm буфере III (BD Biosciences) (100 мкл) в течение 30 мин при 4°C. Клетки промывали дважды буфером FACS и затем повторно суспендировали в анти-pSTAT1 Alexa Fluor 647:FACS буфере 1:10 (100 мкл) в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте, промывали дважды в FACS буфере и анализировали с использованием проточного цитометра MACSQuant (Miltenyi).

Для определения ингибирующей активности испытываемого соединения измеряли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) pSTAT5 в CD14+ моноцитах. Значения IC<sub>50</sub> определяли из анализа кривых ингибирования MFI против концентрации соединения. Данные выражали в виде значений pIC<sub>50</sub> (отрицательный десятичный логарифм IC<sub>50</sub>). Соединение **1** показало значение pIC<sub>50</sub> 6,9 в этом анализе.

#### **Анализ 10: Анализ клеточной активности JAK: Ингибирование IL-12-индуцированного pSTAT4**

Эффективность соединения **1** для ингибирования интерлейкин-12 (IL-12)-стимулированного фосфорилирования STAT4 измеряли в CD3-положительных (CD3+) Т-клетках, полученных из цельной крови человека (Stanford Blood Center) с использованием проточной цитометрии. Поскольку IL-12 передает сигналы через JAK, этот анализ обеспечивает показатель клеточной активности JAK.

CD3+ Т-клетки идентифицировали с использованием фикоэритрин (PE)-конъюгированного с анти-CD3 антитела (клон UCHL1, BD Biosciences), и использовали Alexa Fluor 647-конъюгированное анти-pSTAT4 антитело (клон 38/p-Stat4, BD Biosciences) для детекции фосфорилирования STAT4.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли из цельной крови здоровых доноров с использованием градиента фиколла. Клетки культивировали в RPMI (Life Technologies), дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS, Life Technologies), 2 mM Glutamax (Life Technologies), 25 mM HEPES (Life Technologies), 1X пенициллина/стрептомицина (Life Technologies), связанным на планшете очищенным анти-CD3 антителом (5 мкг/мл, клон UCHL1, BD Biosciences) и растворимым анти-CD28 антителом (1 мкг/мл, клон CD28.2, BD Biosciences), в течение 3 дней в увлажненном инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Клетки собирали, промывали средой и затем ресуспендировали в среде, содержащей интерлейкин-2 (IL-2, 10 нг/мл, R&D Systems). Клетки культивировали в течение 3 дней в увлажненном инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Клетки собирали, промывали RPMI и высевали при 250000 клеток/лунка в среду (200 мкл), культивировали в течение 2 часов и повторно суспендировали в среде для анализа (50 мкл) (RPMI, дополненная 0,1% бычьего сывороточного альбумина (Sigma), 2 mM Glutamax, 25 mM HEPES и 1X пенициллина/стрептомицина), содержащей различные концентрации испытываемого соединения. Соединение серийно разводили в DMSO и затем еще раз разводили 1000-кратно в среде для доведения конечной концентрации DMSO до 0,1%. Разведения испытываемого соединения инкубировали с клетками при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 1 часа с последующим добавлением предварительно нагретого IL-

12 (R&D Systems) в среду (50 мкл) в конечной концентрации 10 нг/мл в течение 30 мин. После стимуляции цитокинами клетки фиксировали предварительно подогретым фиксирующим раствором (100 мкл) (BD Biosciences) в течение 10 мин при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, промывали дважды буфером FACS (1 мл) (1% BSA в PBS) и ресуспендировали в охлажденном льдом Perm буфере III (1000 мкл) (BD Biosciences) в течение 30 мин при 4°C. Клетки промывали дважды буфером FACS и затем ресуспендировали в буфере FACS (100 мкл), содержащем анти-CD3 PE (разведение 1:50) и анти-pSTAT4 Alexa Fluor 647 (разведение 1:10), в течение 45 мин при комнатной температуре в темноте. После инкубации клетки дважды промывали буфером FACS перед анализом с использованием проточного цитометра MACSQuant (Miltenyi). Для определения ингибирующей активности испытываемого соединения измеряли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) pSTAT4 в CD3+ Т-клетках. Значения IC<sub>50</sub> определяли из анализа кривых ингибирования MFI против концентрации соединения. Данные выражали в виде значений pIC<sub>50</sub> (отрицательный десятичный логарифм IC<sub>50</sub>). Соединение **1** показало значение pIC<sub>50</sub> 6,0 в этом анализе.

#### **Анализ 11: Ингибирование секреции IFN $\gamma$ в анализе смешанной реакции лимфоцитов**

Анализ смешанной реакции лимфоцитов представляет собой анализ *in vitro*, который имитирует отторжение трансплантата. Т-клетки от одного донора культивируют с аллогенными дендритными клетками от другого донора. Эта реакция индуцирует клеточный иммунный ответ, такой как секреция IFN $\gamma$ .

CD14+ моноциты выделяли из цельной человеческой крови (Stanford blood center) донора А с использованием градиента фикола и магнитной сепарации (микрогранулы CD14, Miltenyi). Моноциты дифференцировали в дендритные клетки путем культивирования клеток в среде RPMI (Life Technologies), дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS, Life Technologies), 2 mM Glutamax (Life Technologies), 1X пенициллина/стрептомицина (Life Technologies), интерлейкина-4 (IL-4, 50нг/мл, R&D Systems) и гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF, 50 нг/мл, R&D Systems), в течение 6 дней в увлажненном инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Дендритные клетки собирали, промывали средой и затем активировали путем культивирования клеток в среде, содержащей липополисахарид из *Escherichia coli* (LPS, 100 нг/мл, Sigma), в течение 24 часов в увлажненном инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Клетки собирали, промывали средой, ресуспендировали до концентрации 400000 клеток/мл в среде и высевали в количестве 10000 клеток/лунка/25 мкл. CD4+ Т-клетки получали свежевыделенными из цельной человеческой крови (Stanford blood center) донора В с использованием градиента фикола и магнитной сепарации (набор для выделения CD4+ Т-клеток, Miltenyi). Т-клетки ресуспендировали до концентрации 4000000 клеток/мл в RPMI (Life Technologies), дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS, Life Technologies), 2 mM Glutamax (Life Technologies), 25 mM HEPES (Life Technologies) и 1X пенициллина/стрептомицина (Life Technologies). CD4+ Т-клетки

смешивали с дендритными клетками в количестве 100000 клеток/лунка/25 мкл. Клетки обрабатывали испытываемым соединением (50 мкл при 20 мкМ, 2 мкМ и/или 0,2 мкМ) до конечной концентрации 10 мкМ, 1 мкМ и/или 0,1 мкМ. Соединение 1 разбавляли диметилсульфоксидом (DMSO, Sigma) до конечной концентрации 0,1%. DMSO в концентрации 0,1% использовали для контроля в качестве носителя. Клетки выдерживали в течение 5 дней в увлажненном инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. На 5-й день супернатанты собирали и измеряли на интерферон-гамма (IFN $\gamma$ ) с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Процент ингибирования определяли по ингибирующей активности соединения в отношении секреции IFN $\gamma$  по сравнению с клетками, обработанными носителем. Данные являются средними от 4 доноров. Соединение 1 способно ингибировать секрецию IFN $\gamma$  на 99%  $\pm$  0,4 (при 10 мкМ), 76%  $\pm$  10 (при 1 мкМ) и 43%  $\pm$  12 (при 0,1 мкМ) по сравнению с носителем, используемым в качестве контроля.

**Анализ 12: Ингибирование спонтанной секреции периостина и IL-6 в 3D-культурах дыхательных путей человека, полученных от доноров, страдающих астмой**

Культуры тканей EpiAirway были получены от Mattek (AIR-100). Клетки были получены от доноров, страдающих астмой, которые спонтанно секретируют периостин, белок внеклеточного матрикса, связанный с Th2-опосредованной астмой (эозинофильной), и интерлейкин-6 (IL-6), воспалительный цитокин, который играет роль как при Th2, так и при астме, не связанной с Th2. Во вставке для клеточных культур эпителиальные клетки трахеи/бронхов человека выращивали и дифференцировали на пористой мембранной подложке, обеспечивая границу раздела воздух-жидкость с подогретой культуральной средой под клетками и газообразной атмосферой для испытаний над ними. Ткани культивировали в поддерживающей среде (Mattek, AIR-100-MM) в увлажненном инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Тестировали четырех доноров. В день 0 культуры тканей обрабатывали испытываемым соединением на поверхности жидкости при 10 мкМ, 1 мкМ и/или 0,1 мкМ. Соединение 1 разводили в диметилсульфоксиде (DMSO, Sigma) до конечной концентрации 0,1%. DMSO при 0,1% использовали в качестве используемого для контроля носителя. Культуры тканей выдерживали в течение 8 дней. Среду заменяли каждые 2 дня свежей средой, содержащей соединение 1. На 8-й день собирали супернатанты для анализа. Образцы супернатантов анализировали на содержание периостина и интерлейкина-6 (IL-6) с использованием luminex анализа (EMD Millipore). Данные выражены как % ингибирования +/- стандартное отклонение ( $\pm$ STDV). Процент ингибирования определяли по ингибирующей активности соединения в отношении спонтанной секреции периостина и IL-6 по сравнению с клетками, обработанными носителем. Данные являются средними от 3 или 4 доноров. Соединение 1 способно ингибировать спонтанную секрецию периостина на 62%  $\pm$  25 (при 10 мкМ) и 40%  $\pm$  28 (при 1 мкМ) по сравнению с используемым в качестве контроля носителем. Соединение 1 способно ингибировать спонтанную секрецию IL-6 на 91%  $\pm$  9,0 (при 10 мкМ), 70%  $\pm$  33

(при 1 мкМ) и  $10\% \pm 40$  (при 0,1 мкМ) по сравнению с носителем.

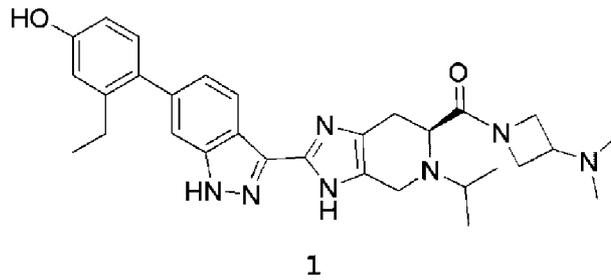
### **Структура кристаллов**

Получали сокристаллическую структуру соединения **C-1**, связанного с JAK1 человека, с разрешением 2,28 Å. Было обнаружено, что лиганд связывается в сайте связывания АТФ. Семь специфических взаимодействий водородного связывания были идентифицированы на основании расстояния 3,5 Å или менее между атомами донора и акцептора. Особо следует отметить водород-связывающее взаимодействие между карбонилем экзоциклического амида соединения **C-1** и боковой цепью Arg879 JAK1. В более ранних исследованиях на моделях это взаимодействие было предложено как способ обеспечения селективности в отношении JAK1 по сравнению с другими тирозинкиназами, поскольку в остальном близкородственные киназы (например, TRKA, VEGFR, ABL1) не имеют аргининового остатка в эквивалентном месте. Наблюдаемые результаты взаимодействия при образовании водородных связей в кристаллической структуре и улучшенная кинематическая селективность по сравнению с сериями, не содержащими экзоциклический амид, подтверждают эту гипотезу дизайна.

Хотя настоящее изобретение было описано со ссылкой на конкретные аспекты или варианты его осуществления, специалистам в данной области техники будет понятно, что возможны различные изменения или заменяющие эквиваленты без отступления от истинной сущности и объема настоящего изобретения. Кроме того, в той степени, в которой это разрешено применимыми патентными законами и правилами, все публикации, патенты и патентные заявки, цитируемые в настоящей заявке, настоящим полностью включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждый документ был отдельно включен в настоящую заявку посредством ссылки.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Кристаллогидрат соединения формулы 1:



где кристаллогидрат характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, включающей дифракционные пики при  $2\theta$  значениях  $5,68\pm 0,20$ ,  $10,43\pm 0,20$ ,  $10,94\pm 0,20$  и  $13,08\pm 0,20$ .

2. Кристаллогидрат по пункту 1, где порошковая рентгеновская дифрактограмма дополнительно характеризуется наличием одного дополнительного дифракционного пика при  $2\theta$  значении  $8,49\pm 0,20$ .

3. Кристаллогидрат по пункту 2, где порошковая рентгеновская дифрактограмма дополнительно характеризуется наличием двух или более дополнительных дифракционных пиков при  $2\theta$  значениях, выбранных из  $11,55\pm 0,20$ ,  $12,20\pm 0,20$ ,  $17,06\pm 0,20$  и  $26,29\pm 0,20$ .

4. Кристаллогидрат по пункту 2, где порошковая рентгеновская дифрактограмма дополнительно характеризуется наличием дополнительных дифракционных пиков при  $2\theta$  значениях  $11,55\pm 0,20$ ,  $12,20\pm 0,20$ ,  $17,06\pm 0,20$  и  $26,29\pm 0,20$ .

5. Кристаллогидрат по любому из пунктов 1-4, где кристаллогидрат характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, на которой положения пиков по существу соответствуют положениям пиков на диаграмме, показанной на Фиг. 1.

6. Кристаллогидрат по любому из пунктов 1-5, где кристаллогидрат характеризуется кривой дифференциальной сканирующей калориметрии, записанной при скорости нагревания  $10^\circ\text{C}$  в минуту, которая показывает максимум в эндотермическом тепловом потоке при температуре  $212,4\pm 3^\circ\text{C}$ .

7. Кристаллогидрат по любому из пунктов 1-6, где кристаллогидрат характеризуется кривой дифференциальной сканирующей калориметрии по существу в соответствии с показанной на Фиг. 2.

8. Кристаллогидрат по любому из пунктов 1-7, где кристаллогидрат представляет собой моногидрат.

9. Фармацевтическая композиция, включающая кристаллогидрат по любому из пунктов 1-8 и фармацевтически приемлемый носитель.

10. Способ получения кристаллогидрата по любому из пунктов 1-8, при этом способ включает:

(а) растворение (S)-(3-(диметиламино)азетидин-1-ил)(2-(6-(2-этил-4-гидроксифенил)-1H-индазол-3-ил)-5-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-3H-имидазо[4,5-

с]пиридин-6-ил)метанона в спиртовом растворителе при температуре  $55^{\circ}\text{C}\pm 10^{\circ}\text{C}$  с получением раствора;

(b) охлаждение раствора, полученного на стадии (a), до  $10^{\circ}\text{C}\pm 10^{\circ}\text{C}$  с получением суспензии;

(c) выделение твердого вещества из суспензии стадии (b) в условиях инертного газа;

(d) сушку твердого вещества, полученного на стадии (c), при  $60^{\circ}\text{C}\pm 15^{\circ}\text{C}$ ;

(e) выдерживание твердого вещества, полученного на стадии (d), в условиях влажности и температуры окружающей среды с получением кристаллогидрата.

11. Способ по пункту 10, где спиртовой растворитель представляет собой метанол или этанол.

12. Кристаллогидрат по любому из пунктов 1-8 для лечения респираторного заболевания у млекопитающего.

13. Кристаллогидрат по пункту 12, где респираторное заболевание выбрано из группы, состоящей из астмы, хронической обструктивной болезни легких, кистозного фиброза, пневмонита, идиопатического легочного фиброза, острого поражения легких, острого респираторного дистресс-синдрома, бронхита, эмфиземы, саркоидоза, эозинофильного заболевания, гельминтоза, легочной артериальной гипертензии, лимфангиолейомиоматоза, бронхоэктаза, инфильтративного заболевания легких, лекарственно-индуцированного пневмонита, индуцированного грибками пневмонита, аллергического бронхолегочного аспергиллеза, гиперчувствительного пневмонита, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом, идиопатической острой эозинофильной пневмонии, идиопатической хронической эозинофильной пневмонии, гиперэозинофильного синдрома, синдрома Леффлера, облитерирующего бронхиолита с организуемой пневмонией, болезни "легочный трансплантат против хозяина" и индуцированного ингибитором иммунных контрольных точек пневмонита.

14. Кристаллогидрат по пункту 12, где респираторное заболевание представляет собой астму.

15. Кристаллогидрат по пункту 14, где астма представляет собой астму от умеренной до тяжелой степени.

16. Кристаллогидрат по пункту 12, где кристаллогидрат вводят в фармацевтической композиции путем ингаляции.

17. Кристаллогидрат по любому из пунктов 1-8 для профилактики или отсрочки отторжения легочного трансплантата у млекопитающего.

18. Кристаллогидрат по пункту 17, где отторжение легочного трансплантата выбрано из группы, состоящей из первичной дисфункции трансплантата, организуемой пневмонии, острого отторжения, лимфоцитарного бронхиолита и хронической дисфункции легочного аллотрансплантата.

19. Кристаллогидрат по пункту 17, где отторжение легочного трансплантата представляет собой острое отторжение легочного трансплантата.

20. Кристаллогидрат по пункту 17, где отторжение легочного трансплантата представляет собой хроническую дисфункцию легочного аллотрансплантата.

21. Кристаллогидрат по пункту 17, где отторжение легочного трансплантата выбрано из группы, состоящей из облитерирующего бронхиолита, рестриктивной хронической дисфункции легочного аллотрансплантата и нейтрофильной дисфункции аллотрансплантата.

22. Кристаллогидрат по пункту 17, где кристаллогидрат вводят в фармацевтической композиции путем ингаляции.

23. Применение кристаллогидрата по любому из пунктов 1-8 для получения лекарственного средства для лечения респираторного заболевания у млекопитающего.

24. Применение по пункту 23, где респираторное заболевание выбрано из группы, состоящей из астмы, хронической обструктивной болезни легких, кистозного фиброза, пневмонита, идиопатического легочного фиброза, острого поражения легких, острого респираторного дистресс-синдрома, бронхита, эмфиземы, саркоидоза, эозинофильного заболевания, гельминтоза, легочной артериальной гипертензии, лимфангиолейомиоматоза, бронхоэктаза, инфильтративного заболевания легких, лекарственно-индуцированного пневмонита, индуцированного грибами пневмонита, аллергического бронхолегочного аспергиллеза, гиперчувствительного пневмонита, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом, идиопатической острой эозинофильной пневмонии, идиопатической хронической эозинофильной пневмонии, гиперэозинофильного синдрома, синдрома Леффлера, облитерирующего бронхиолита с организуемой пневмонией, болезни "легочный трансплантат против хозяина" и индуцированного ингибитором иммунных контрольных точек пневмонита.

25. Применение по пункту 23, где респираторное заболевание представляет собой астму.

26. Применение по пункту 25, где астма представляет собой астму от умеренной до тяжелой степени.

27. Применение по пункту 23, где лекарственное средство вводят путем ингаляции.

28. Применение кристаллогидрата по любому из пунктов 1 для получения лекарственного средства для профилактики или отсрочки отторжения легочного трансплантата у млекопитающего.

29. Применение по пункту 28, где отторжение легочного трансплантата выбрано из группы, состоящей из первичной дисфункции трансплантата, организуемой пневмонии, острого отторжения, лимфоцитарного бронхиолита и хронической дисфункции легочного аллотрансплантата.

30. Применение по пункту 28, где отторжение легочного трансплантата представляет собой острое отторжение легочного трансплантата.

31. Применение по пункту 28, где отторжение легочного трансплантата представляет собой хроническую дисфункцию легочного аллотрансплантата.

32. Применение по пункту 28, где отторжение легочного трансплантата выбрано из

группы, состоящей из облитерирующего бронхиолита, рестриктивной хронической дисфункции легочного аллотрансплантата и нейтрофильной дисфункции аллотрансплантата.

33. Применение по пункту 28, где лекарственное средство вводят путем ингаляции.

34. Способ лечения респираторного заболевания у млекопитающего, при этом способ включает введение млекопитающему фармацевтической композиции, включающей кристаллогидрат по любому из пунктов 1-8 и фармацевтически приемлемый носитель.

35. Способ по пункту 34, где респираторное заболевание выбрано из группы, состоящей из астмы, хронической обструктивной болезни легких, кистозного фиброза, пневмонита, идиопатического легочного фиброза, острого поражения легких, острого респираторного дистресс-синдрома, бронхита, эмфиземы, саркоидоза, эозинофильного заболевания, гельминтоза, легочной артериальной гипертензии, лимфангиолейомиоматоза, бронхоэктаза, инфильтративного заболевания легких, лекарственно-индуцированного пневмонита, индуцированного грибами пневмонита, аллергического бронхолегочного аспергиллеза, гиперчувствительного пневмонита, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом, идиопатической острой эозинофильной пневмонии, идиопатической хронической эозинофильной пневмонии, гиперэозинофильного синдрома, синдрома Леффлера, облитерирующего бронхиолита с организуемой пневмонией, болезни "легочный трансплантат против хозяина" и индуцированного ингибитором иммунных контрольных точек пневмонита.

36. Способ по пункту 34, где респираторное заболевание представляет собой астму.

37. Способ по пункту 36, где астма представляет собой астму от умеренной до тяжелой степени.

38. Способ по пункту 34, где фармацевтическую композицию вводят путем ингаляции.

39. Способ профилактики или отсрочки отторжения легочного трансплантата у млекопитающего, при этом способ включает введение млекопитающему фармацевтической композиции, включающей кристаллогидрат по любому из пунктов 1-8 и фармацевтически приемлемый носитель.

40. Способ по пункту 39, где отторжение легочного трансплантата выбрано из группы, состоящей из первичной дисфункции трансплантата, организуемой пневмонии, острого отторжения, лимфоцитарного бронхиолита и хронической дисфункции легочного аллотрансплантата.

41. Способ по пункту 39, где отторжение легочного трансплантата представляет собой острое отторжение легочного трансплантата.

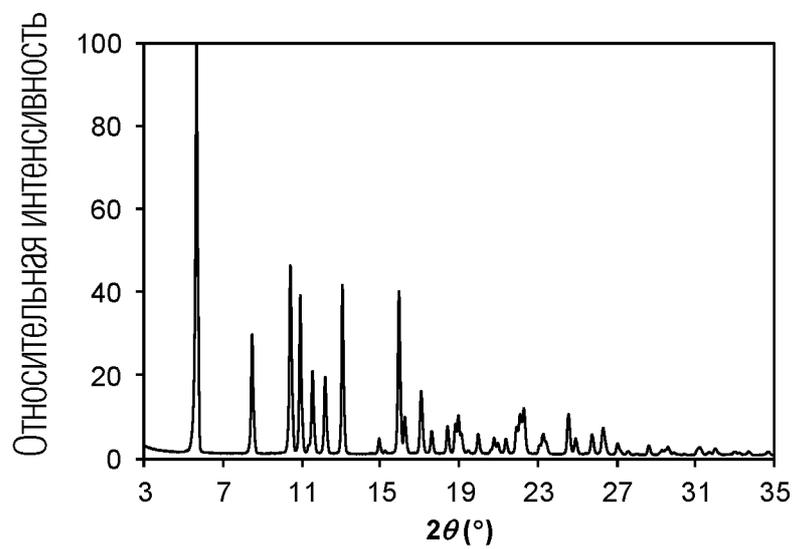
42. Способ по пункту 39, где отторжение легочного трансплантата представляет собой хроническую дисфункцию легочного аллотрансплантата.

43. Способ по пункту 39, где отторжение легочного трансплантата выбрано из группы, состоящей из облитерирующего бронхиолита, рестриктивной хронической

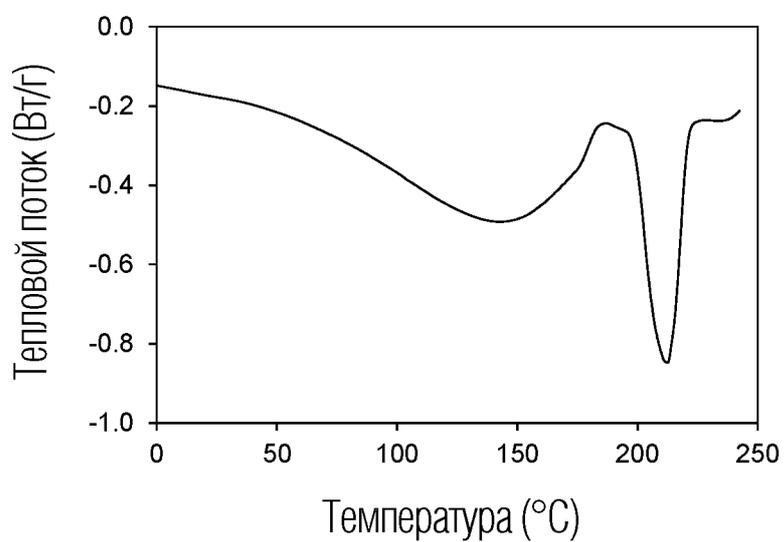
дисфункции легочного аллотрансплантата и нейтрофильной дисфункции аллотрансплантата.

44. Способ по пункту 39, где фармацевтическую композицию вводят путем ингаляции.

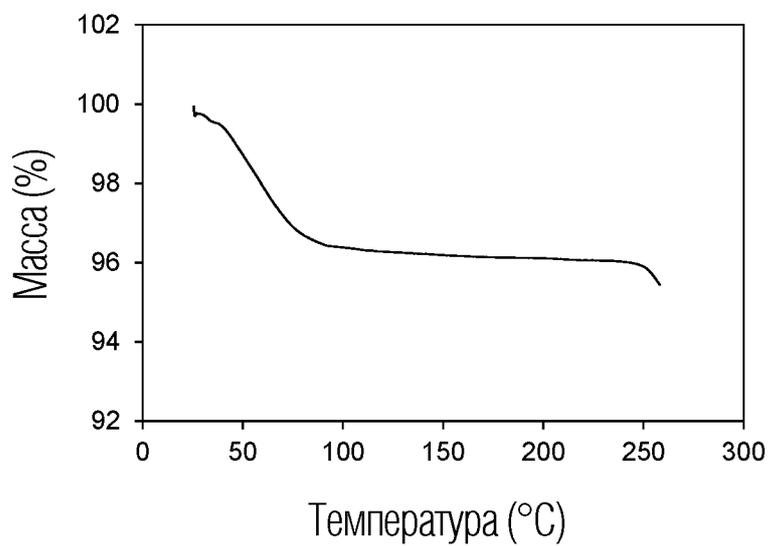
1/2



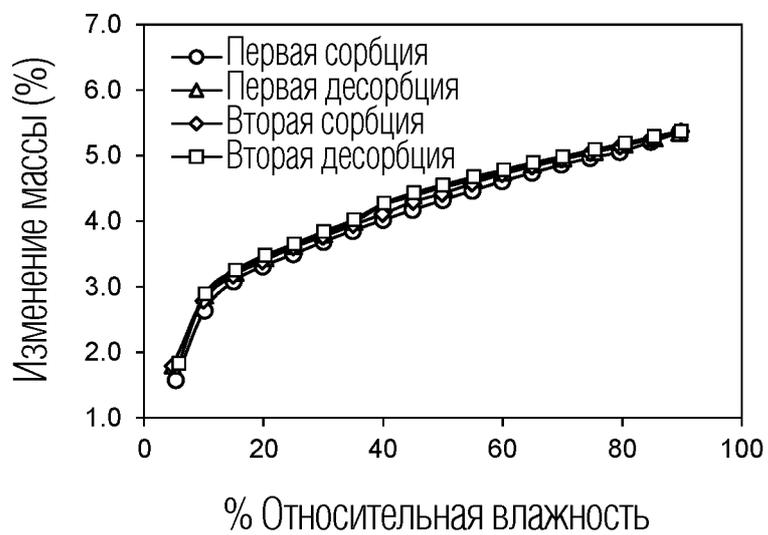
ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3



ФИГ. 4