

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **031830**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.02.28

(21) Номер заявки
201790476

(22) Дата подачи заявки
2015.09.30

(51) Int. Cl. **C07D 401/14** (2006.01)
C07D 405/14 (2006.01)
C07D 401/12 (2006.01)
A61K 31/454 (2006.01)
A61K 31/4545 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

**(54) АМИНОПИРИДИЛОКСИПИРАЗОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ
ИНГИБИТОРОВ АКТИВНОСТИ РЕЦЕПТОРА 1 ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА
РОСТА БЕТА (TGFβR1)**

(31) **62/060,724**

(32) **2014.10.07**

(33) **US**

(43) **2017.08.31**

(86) **PCT/US2015/053098**

(87) **WO 2016/057278 2016.04.14**

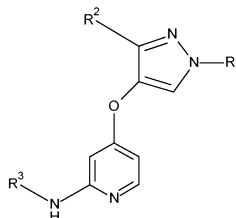
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
**Бейт Дуглас В., Коатес Дэвид А.,
Джозеф Саджан, Макмиллен Уильям
Т., Паргасарати Сараванан, Пэй
Хуасин, Сойер Джейсон Скотт,
Волфанджел Крэйг Д., Чжао Гайин
(US)**

(74) Представитель:
**Лыу Т.Н., Угрюмов В.М., Гизатуллина
Е.М., Глухарёва А.О., Дементьев
В.Н., Карпенко О.Ю., Клюкин В.А.,
Строкова О.В., Христофоров А.А.
(RU)**

(56) **WO-A1-2009022171**
**SAWYER J.S. ET AL.: "Synthesis and
activity of new aryl- and heteroaryl-substituted
pyrazole inhibitors of the transforming growth factor-
beta type I receptor kinase domain", JOURNAL
OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN
CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 46, no. 19, 11
September 2003 (2003-09-11), pages 3953-3956,
XP002265227, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/
JM0205705, compounds 1-20
WO-A1-2004111036
WO-A1-2013086397**

(57) Изобретение относится к новым аминопиридилоксипиразольным соединениям, которые ингибируют активность рецептора 1 трансформирующего фактора роста бета (TGFβR1) и имеют формулу



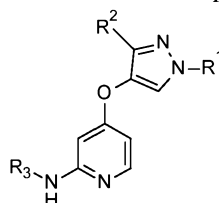
Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанные соединения, а также к способам применения указанных соединений для лечения рака, предпочтительно рака толстой кишки, меланомы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака почки, глиобластомы, рака поджелудочной железы, миелодиспластического синдрома, рака легких и рака желудка и/или фиброза, предпочтительно фиброза печени и хронического заболевания почек.

B1**031830****031830****B1**

Изобретение относится к новым аминопиридилоксипиразольным соединениям, которые ингибируют активность рецептора I трансформирующего фактора роста бета (TGFβR1), к фармацевтическим композициям, содержащим указанные соединения, а также к способам применения указанных соединений для лечения рака, предпочтительно рака толстой кишки, меланомы, гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), рака почки, глиобластомы (GBM), рака поджелудочной железы, миелодиспластического синдрома (MDS), рака легких и рака желудка и/или фиброза, предпочтительно фиброза печени и хронического заболевания почек.

Трансформирующий фактор роста бета (TGF-бета или TGFβ) представляет собой многофункциональный цитокин, который связывается с гетеромерными комплексами серин/треонинкиназных рецепторов типа I и типа II TGF-бета и активирует указанный рецепторный комплекс TGF-бета, который фосфорилирует и активирует SMAD2 и SMAD3, которые далее связываются с SMAD4 и перемещаются в ядро, и регулируют экспрессию различных генов-мишеней. Основные участники пути передачи сигнала рецептора TGF-бета включают TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3, TGFβR1, TGFβR2, SMAD, SnoN, SARA, SKI, DAB, TRAP, TAK1, SMIF, E2F4, E2F5, RBL1, RBL2, RB1, TFDP1, TFDP2, SMURF1, SMURF2, P300, CBP и JUN. SMAD-опосредованный путь рецептора TGF-бета регулирует различные клеточные и физиологические процессы, такие как пролиферацию, дифференцировку, рост, миграцию, миелинизацию, арест клеточного цикла, апоптоз и развитие.

В данной области техники уже известны низкомолекулярные ингибиторы TGFβR1 для лечения рака и/или фиброза. См., например, публикации WO 2012/002680, WO 2009/022171, WO 2004/048382 и WO 2002/094833. К сожалению, известных радикальных средств для лечения многих типов рака или фиброза не существует. Было бы желательно располагать дополнительными низкомолекулярными ингибиторами TGFβR1 для лечения рака, предпочтительно рака толстой кишки, меланомы, гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), рака почки, глиобластомы (GBM), рака поджелудочной железы, миелодиспластического синдрома (MDS), рака легких и рака желудка и/или фиброза, предпочтительно фиброза печени и хронического заболевания почек, в частности, соединениями, которые более селективны в отношении TGFβR1. В настоящем изобретении предложено соединение формулы



где R¹ представляет собой водород, изопропил, диформетил, дифторэтил или циклопропил;

R² представляет собой этил, трет-бутил, пиридин-2-ил, тетрагидропиран-4-ил, тетрагидрофуран-3-ил, циклопропил или циклобутил; и

R³ представляет собой карбамоилфенил, пиридин-2-ил, (1-гидрокси-1-метилэтил)пиридинил, 1-метил-2-оксо-1Н-пиридин-4-ил, 1-метилпиразолил, пиразин-2-ил, 2-метоксиимидин-4-ил, 1-метил-2-оксо-1Н-пиримидин-4-ил, пиридазин-3-ил, 6-хлорпиридазин-3-ил, 6-метилпиридазин-3-ил или 6-метоксипиридазин-3-ил; или его фармацевтически приемлемая соль.

В настоящем изобретении также предложен 2-{4-[(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол или его фармацевтически приемлемая соль.

В настоящем изобретении также предложен 2-{4-[(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол 4-метилбензолсульфонат.

В настоящем изобретении также предложен кристаллический 2-{4-[(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол 4-метилбензолсульфонат. В настоящем изобретении также предложен кристаллический 2-{4-[(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол 4-метилбензолсульфонат, характеризующийся дифрактограммой рентгеновской порошковой дифракции (излучение меди, λ-1,54060 Å), содержащей пик при 17,8° с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из 19,7°, 18,4° и 22,0° (2θ ± 0,2°).

В настоящем изобретении также предложен способ лечения рака, предпочтительно рака толстой кишки, меланомы, гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), рака почки, глиобластомы (GBM), рака поджелудочной железы, миелодиспластического синдрома (MDS), рака легких и рака желудка, у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий введение указанному пациенту эффективного количества соединения или соли согласно настоящему изобретению.

В изобретении также предложен способ лечения фиброза, предпочтительно фиброза печени и хронического заболевания почек у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий введение указанному пациенту эффективного количества соединения или соли согласно настоящему изобретению.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая соедине-

ние или соль согласно настоящему изобретению и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, носителей или разбавителей.

В данном изобретении также предложено соединению или соль согласно настоящему изобретению для применения в терапии. Кроме того, в данном изобретении предложено соединение или соль согласно настоящему изобретению для применения для лечения рака, предпочтительно рака толстой кишки, меланомы, гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), рака почки, глиобластомы (GBM), рака поджелудочной железы, миелодиспластического синдрома (MDS), рака легких и рака желудка и/или фиброза, предпочтительно фиброза печени и хронического заболевания почек. Кроме того, в данном изобретении предложено применение соединения или соли согласно настоящему изобретению в производстве лекарственного средства для лечения рака, предпочтительно рака толстой кишки, меланомы, гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), рака почки, глиобластомы (GBM), рака поджелудочной железы, миелодиспластического синдрома (MDS), рака легких и рака желудка и/или фиброза, предпочтительно фиброза печени и хронического заболевания почек.

В следующих пунктах описаны предпочтительные классы согласно настоящему изобретению:

- a) R¹ представляет собой дифторметил, дифторэтил или циклопропил;
- b) R² представляет собой пиридин-2-ил, тетрагидропиран-4-ил или циклопропил;
- c) R³ представляет собой карбамоилфенил или (1-гидрокси-1-метилэтил)пиридинил;
- d) R¹ представляет собой циклопропил, и R² представляет собой тетрагидропиран-4-ил;
- e) R¹ представляет собой циклопропил и R² представляет собой циклопропил;
- f) R¹ представляет собой дифторэтил и R² представляет собой тетрагидропиран-4-ил;
- g) R¹ представляет собой дифторметил и R² представляет собой пиридин-2-ил;
- h) R¹ представляет собой циклопропил, R² представляет собой тетрагидропиран-4-ил и R³ представляет собой (1-гидрокси-1-метилэтил)пиридинил;
- i) R¹ представляет собой циклопропил, R² представляет собой циклопропил и R³ представляет собой (1-гидрокси-1-метилэтил)пиридинил;
- j) R¹ представляет собой дифторэтил, R² представляет собой тетрагидропиран-4-ил и R³ представляет собой (1-гидрокси-1-метилэтил)пиридинил; и
- k) R¹ представляет собой дифторметил, R² представляет собой пиридин-2-ил и R³ представляет собой карбамоилфенил.

Читателю-специалисту в данной области техники будет понятно, что формы указанных соединений в виде свободных оснований согласно настоящему изобретению способны образовывать соли, и такие соли рассматриваются как часть настоящего изобретения. Соединения в форме свободных оснований согласно настоящему изобретению представляют собой амины, и соответственно реагируют с любой из числа неорганических и органических кислот с образованием фармацевтически приемлемых кислотно-аддитивных солей. Такие фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли и общая методология для их получения хорошо известны в данной области техники. См., например, P.Stahl и др., *HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE*, (VCH/Wiley-VCH, 2008); S.M.Berge и др., «Pharmaceutical Salts», *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 66, No. 1, January 1977. Специалисту в данной области техники понятно, что стехиометрию соли можно легко определить. См., например, D. Risley и др., *Simultaneous Determination of Positive and Negative Counterions Using a Hydrophilic Interaction Chromatography Method*, *LCGC NORTH AMERICA*, Vol. 24, No. 8, August 2006, pages 776-785.

Некоторые из указанных соединений согласно настоящему изобретению являются кристаллическими. В области кристаллографии хорошо известно, что для любой данной кристаллической формы относительные интенсивности дифракционных пиков могут варьироваться в зависимости от преимущественной ориентации из-за таких факторов, как морфология кристалла и гибитус. Там, где присутствуют эффекты предпочтительной ориентации, интенсивности пиков изменяются, однако не меняются характерные позиции пиков полиморфа. См., например, Фармакопея США № 23, Национальный формуляр № 18, стр. 1843-1844, 1995. Кроме того, в области кристаллографии также хорошо известно, что для любой данной кристаллической формы угловые положения пиков могут слегка отличаться. Например, положения пиков могут смещаться из-за изменения температуры или влажности, при которых анализируется образец, смещения образца, или присутствия или отсутствия внутреннего стандарта. В данном случае варьирование положение пика $\pm 0,2$ в 2θ будет учитывать эти потенциальные изменения, не препятствуя однозначной идентификации указанной кристаллической формы. Подтверждение кристаллической формы можно произвести на основе любой уникальной комбинации различающихся пиков (в единицах $^{\circ}2\theta$), обычно более крупных пиков. Рентгеновские дифрактограммы кристаллических форм, полученные при температуре окружающей среды и относительной влажности, корректируют на основании стандартных пиков NIST 675 при 8,853 и 26,774 градусов 2-тета.

Указанные соединения согласно настоящему изобретению можно получить согласно следующим схемам синтеза при помощи способов, хорошо известных и признанных в данной области техники. Подходящие условия реакций для стадий данных схем хорошо известны в данной области техники и соот-

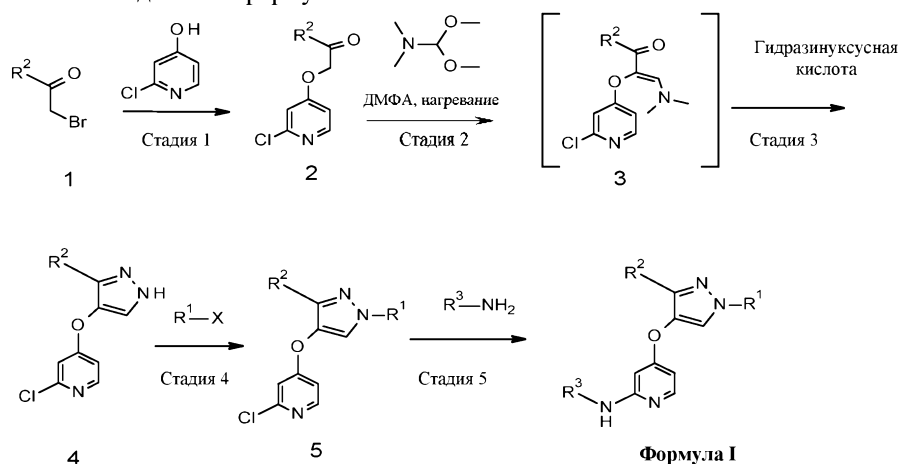
ветствующие замены для растворителей и сопутствующих реагентов известны специалистам в данной области техники. Подобным же образом специалистам в данной области техники будет понятно, что синтетические промежуточные соединения можно выделить и/или очистить путем различных хорошо известных методик при необходимости или при желании, и зачастую возможно применение различных промежуточных соединений непосредственно в последующих стадиях синтеза с небольшой очисткой или без нее. Более того, специалисту в данной области будет понятно, что в некоторых случаях порядок, в котором вводятся фрагменты, не имеет решающего значения. Конкретный порядок стадий, необходимый для получения указанных соединений согласно настоящему изобретению, зависит от конкретного синтезируемого соединения, исходного соединения и относительной лабильности замещенных остатков, что хорошо понятно специалисту в области химии. Все заместители, если не указано иное, представляют собой определенные выше заместители, и все реагенты хорошо известны и признаны в данной области техники.

Некоторые промежуточные соединения или соединения согласно настоящему изобретению могут иметь один или более хиральных центров. Настоящее изобретение включает все индивидуальные энантиомеры или диастереомеры, также как и смеси энантиомеров и диастереомеров указанных соединений, включая рацематы. Предпочтительно, чтобы соединения согласно настоящему изобретению, содержащие по меньшей мере один хиральный центр, существовали в виде одиночных энантиомеров или диастереомеров. Указанные одиночные энантиомеры или диастереомеры можно получить, начиная с хиральных реагентов или путем стереоселективных или стереоспецифичных синтетических методов. В качестве альтернативы указанные одиночные энантиомеры или диастереомеры можно выделить из смесей при помощи стандартных хиральных хроматографических методов или методами кристаллизации. Специалисту в данной области техники будет понятно, что в некоторых случаях порядок элюирования энантиомеров или диастереомеров может быть различным вследствие различных хроматографических колонок и подвижных фаз.

Указание "изомер 1" в названии соединения обозначает, что соответствующий интермедиат или соединение согласно настоящему изобретению является первым из двух элюированных энантиомеров, когда смесь пары энантиомеров разделяют при помощи хиральной хроматографии. Указание "изомер 2" в названии соединения обозначает, что соответствующий интермедиат или соединение согласно настоящему изобретению является вторым из двух элюированных энантиомеров, когда смесь пары энантиомеров разделяют при помощи хиральной хроматографии.

Соединения согласно настоящему изобретению можно синтезировать так, как представлено на следующих схемах, где R^1 , R^2 и R^3 определены ранее.

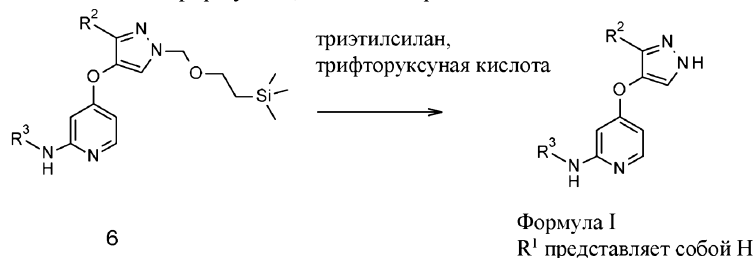
Схема 1. Синтез соединений формулы I



На схеме 1 представлен общий синтез соединений формулы I. Соединение 1 подвергают взаимодействию с 2-хлорпиридин-4-олом в подходящем растворителе, таком как диметилформамид (ДМФА) или ацетон, с подходящим основанием, таким как карбонат цезия или карбонат калия, при комнатной температуре или при повышенной температуре с получением соединения 2. Соединение 2 подвергают взаимодействию с 1,1-диметокси-N,N-диметилметанамином при повышенной температуре с образованием соединения 3. Можно произвести очистку соединения 3 или применять его без дополнительной очистки для осуществления взаимодействия с гидразином в уксусной кислоте с получением соединения 4. Соединение 4 можно подвергать взаимодействию с подходящим для алкилирования реагентом, таким как алкилтрифторборат калия или алкилбороновая кислота, в условиях реакции сочетания Чана-Лама (Chan-Lam coupling) с образованием соединения 5. Более конкретно, суспензию 2,2'-бипиридина и ацетата меди (II) в подходящем растворителе, таком как 1,2-дихлорэтан, изначально нагревают до повышенной температуры и продувают азотом, и далее указанную реакционную смесь фильтруют и указанный фильтрат добавляют к смеси соединения 4, подходящего бороната, такого как алкилтрифторборат калия или алкилбороновая кислота, и подходящего основания, такого как карбонат натрия, в подходящем рас-

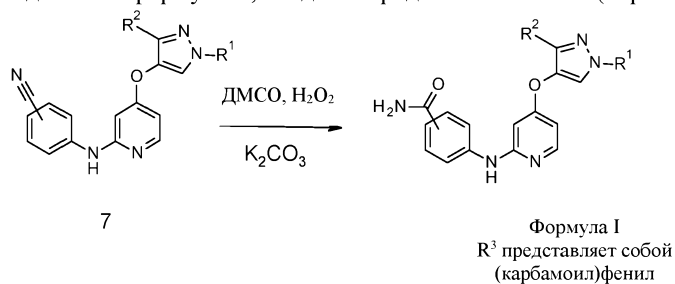
творителе, таком как 1,2-дихлорэтан. Указанную реакционную смесь нагревают до повышенной температуры с получением соединения 5. Соединение 4 также можно подвергать взаимодействию с подходящим алкилгалогенидом, таким как алкилиодидом, алкилбромидом или алкилхлоридом, с подходящим основанием, таким как гидрид натрия, в подходящем растворителе, таком как ДМФА или тетрагидрофуран (ТГФ), с получением соединения 5. Соединение 5 подвергают взаимодействию с подходящим амином в известных условиях реакции сочетания Бухвальда (Buchwald coupling) с получением соединения формулы I. Более конкретно соединение 5 подвергают взаимодействию с подходящим амином при повышенной температуре в присутствии подходящего основания, такого как карбонат цезия, подходящего лигандного реагента, такого как 4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантен, и подходящего катализатора, такого как ацетат палладия (II), в подходящем растворителе, таком как 1,4-диоксан, с получением соединения формулы I.

Схема 2. Синтез соединений формулы I, когда R^1 представляет собой H



На схеме 2 представлен общий синтез соединений формулы I, когда R^1 представляет собой H. Как показано на стадии 4 схемы 1, когда алкилирующим реагентом является 2-(триметилсиль)этоксиметилхлорид, соединение 6 может быть получено при помощи алкилирования в соответствии со стадией 4 и реакцией сочетания Бухвальда в соответствии со стадией 5. Соединение 6 можно подвергать взаимодействию с триэтилсиланом в трифторуксусной кислоте с получением соединения формулы I, в которой R^1 представляет собой H. Когда R^1 представляет собой H, специалистам в данной области техники известно, что соединение формулы I может существовать в виде пары таутомеров, в которых водород может перемещаться между двумя атомами азота на пиразольном кольце.

Схема 3. Синтез соединений формулы I, когда R^3 представляет собой (карбамоил)фенил

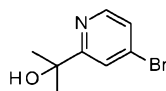


На схеме 3 представлен общий синтез соединений формулы I, когда R^3 представляет собой (карбамоил)фенильную группу. Соединение 7 можно получить при помощи способа, представленного на стадии 5 схемы 1, когда R^3 представляет собой подходящим образом замещенный бензонитрил. Соединение 7 подвергают взаимодействию с пероксидом водорода и подходящим основанием, таким как карбонат калия, в диметилсульфоксиде (ДМСО) с получением соединения формулы I, когда R^3 представляет собой (карбамоил)фенильную группу.

В контексте настоящего описания следующие термины имеют следующие значения: "ACN" относится к ацетонитрилу; "БСА" относится к бычьему сывороточному альбумину; "ДХМ" относится к дихлорметану; "ДМФА" обозначает N,N-диметилформамид; "ДМСО" относится к диметилсульфоксиду; "ДТТ" относится к дитиотреитолу; "EDTA" относится к этилендиаминтетрауксусной кислоте; "EGTA" относится к этиленгликольтетрауксусной кислоте; "ИФА" относится к иммуноферментному анализу; "EtOAc" относится к этилацетату; "EtOH" относится к этанолу; "ФБС" относится к фетальной бычьей сыворотке; "ГЭЦ" относится к гидроксизтилцеллюлозе; "ВЭЖХ" относится к высокоэффективной жидкостной хроматографии; "IVTI" относится к целевому ингибированию in vivo; "МС" относится к масс-спектрологии; "MeOH" относится к метанолу; "ЯМР" обозначает ядерный магнитный резонанс; "ТГФ" относится к тетрагидрофурану; "ТБС" относится к Трис-буферному солевому раствору; "TED" относится к пороговой эффективной дозе; "УФВ" относится к длине волны ультрафиолетовой области и "XRD" относится к рентгеновской порошковой дифракции.

Если не указано иное, то соединения, представленные в данном описании, названы и пронумерованы с применением либо ACDLABS, либо Accelrys Draw 4.1.

Пример получения 1. 2-(4-Бром-2-пиридил)пропан-2-ол



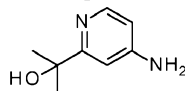
Трехлитровую трехгорлую круглодонную колбу оснащают капельной воронкой, обратным холодильником, входным отверстием для азота и датчиком температуры. Вносят метилмагнийбромид (3,2М в 2-метилтетрагидрофуране, 239,07 мл, 765,01 ммоль) и охлаждают на ледяной бане. В капельную воронку добавляют раствор этил-4-бромпиридин-2-карбоксилата (80,0 г, 347,73 ммоль) в ТГФ (800,0 мл). Указанный раствор добавляют по каплям к раствору метилмагнийбромида, поддерживая при этом внутреннюю температуру ниже 25°C. Охлаждающую баню удаляют и осуществляют перемешивание при 25°C в течение 30 мин. Указанную реакционную смесь охлаждают до 5°C и реакцию осторожно гасят добавлением по каплям водного раствора соляной кислоты (1М), поддерживая при этом внутреннюю температуру ниже 30°C. Дополнительный водный раствор соляной кислоты (1М) добавляют до тех пор, пока значение pH указанной смеси не достигнет порядка 7. Охлаждающую баню удаляют и разбавляют этилацетатом (EtOAc, 200 мл). Органический слой отделяют, сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют через слой CELITE® и промывают EtOAc. Указанный фильтрат концентрируют с получением масла оранжевого цвета. Очищают при помощи слоя силикагеля путем элюирования смесью гексан/EtOAc (3/1) с получением указанного в заголовке соединения (63,15 г, выход 84,0%) в виде бесцветного масла. МС (m/z): 216/218 (M+1/M+3).

Следующее соединение получают, по существу, при помощи способа согласно примеру получения 1.

Таблица 1

№ примера получения	Химическое наименование	Структура	Физические данные
2	2-(5-бром-2-пиридил)пропан-2-ол		МС (m/z): 216/218 (M+1/M+3)

Пример получения 3. 2-(4-Амино-2-пиридил)пропан-2-ол



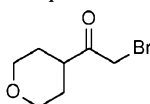
В двухлитровый реактор Парра вносят стержень магнитной мешалки, медь (просеянный порошок, 12,6 г, 198,6 ммоль), 2-(4-бром-2-пиридил)пропан-2-ол (63,1 г, 292,0 ммоль) и гидроксид аммония (28 мас./мас.% в воде, 757,2 мл). Указанную реакционную смесь перемешивают под открытым воздухом в течение 30 мин, пока она не станет темно-синей. Стержень магнитной мешалки удаляют, сверху прикрепляют устройство для механического перемешивания, герметично закрывают и размещают на мешалке. Указанную смесь нагревают до 100°C (внутренняя нагревающая баня при 120°C) и перемешивают в течение ночи. Указанную реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и добавляют 2-метилтетрагидрофуран (600 мл). Фильтруют через слой CELITE® и промывают 2-метилтетрагидрофураном. Органический слой отделяют и водный слой подвергают экстракции посредством 2-метилтетрагидрофурана (200 мл). Органические слои объединяют и сушат над безводным сульфатом натрия. Фильтруют, концентрируют и сушат под вакуумом в течение ночи с получением указанного в заголовке соединения (31,3 г, выход 70,4%) в виде желтого масла. МС (m/z): 153 (M+1).

Следующее соединение получают, по существу, при помощи способа согласно примеру получения 3.

Таблица 2

№ примера получения	Химическое наименование	Структура	Физические данные
4	2-(5-амино-2-пиридил)пропан-2-ол		МС (m/z): 153 (M+1)

Пример получения 5. 2-Бром-1-тетрагидропиран-4-илэтанон

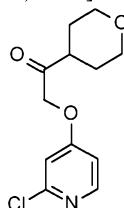


Способ 1. К смеси тетрагидропиран-4-карбоновой кислоты (39,13 г, 300,67 ммоль) в ДХМ (250 мл) и ДМФА (15 капель) добавляют оксалилхлорид (28,69 мл, 330,73 ммоль). Указанную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2,5 ч в атмосфере азота. Концентрируют при пониженном давлении и остаток растворяют в ДХМ (250 мл). Полученный раствор по каплям добавляют к (триметил-

силил)дiazометану (2М в гексане, 450 мл, 900,00 ммоль) при -10°C и указанную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Смесь охлаждают до 0°C и по каплям добавляют бромистоводородную кислоту (48 мас./мас.% в воде, 52 мл, 462,73 ммоль). Указанную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение двух часов. Смесь охлаждают до 0°C и по каплям добавляют бромистоводородную кислоту (48 мас./мас.% в воде, 26 мл, 231,36 ммоль). Указанную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение двух часов. Добавляют воду (250 мл), ДХМ (250 мл) и отделяют органический слой. Водный слой подвергают экстракции посредством ДХМ (2×250 мл). Органические слои объединяют и промывают насыщенным водным раствором бикарбоната натрия и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Сушат над безводным сульфатом натрия и концентрируют при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения (58,2 г, выход 93,48%) в виде коричневого твердого вещества. ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 4,00 (m, 2H), 3,95 (s, 2H), 3,45 (m, 2H), 2,98 (m, 1H), 1,78 (m, 4H).

Способ 2. Раствор 1-тетрагидропиран-4-илэтанона (10 г, 78,02 ммоль) в метаноле (MeOH, 50 мл) охлаждают до температуры -10°C . По каплям добавляют бром (4,01 мл, 78,02 ммоль). Указанную смесь перемешивают при 0°C в течение 45 мин и далее при 10°C в течение 45 мин. Добавляют водный раствор серной кислоты (11М, 27,5 мл, 302,50 ммоль) и полученную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Добавляют воду и три раза подвергают экстракции посредством диэтилового эфира. Указанные органические слои объединяют. Промывают водным раствором бикарбоната натрия и водой. Сушат над безводным сульфатом натрия и концентрируют при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения (12 г, выход 74,28%) в виде белого твердого вещества. ^1H -ЯМР (400,13 МГц, CDCl_3) δ 4,00 (m, 2H), 3,95 (s, 2H), 3,45 (m, 2H), 2,98 (m, 1H), 1,78 (m, 4H).

Пример получения 6. 2-[(2-Хлор-4-пиридил)окси]-1-тетрагидропиран-4-илэтанон

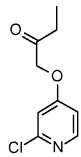
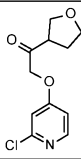
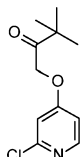
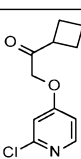
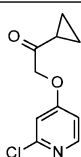
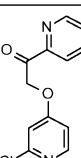


Способ 1. К перемешиваемой смеси 2-хлорпиридин-4-ола (13,85 г, 106,91 ммоль) и карбоната цезия (69,67 г, 213,82 ммоль) в ДМФА (380 мл) по каплям добавляют раствор 2-бром-1-тетрагидропиран-4-илэтанона (24,35 г, 117,60 ммоль) в ДМФА (50 мл) при комнатной температуре. Указанную полученную смесь перемешивают при 90°C в течение 2,5 ч. Охлаждают до комнатной температуры с получением неочищенной смеси. Объединяют с неочищенной смесью, полученной при проведении реакции в другом масштабе (2,85 г 2-хлорпиридин-4-ола), как указано выше. Указанную комбинированную смесь разводят водой (200 мл) и EtOAc (300 мл). Органический слой отделяют и водный слой подвергают экстракции посредством EtOAc (3×250 мл). Указанные органические слои объединяют и промывают водой (100 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (100 мл). Сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют и указанный фильтрат концентрируют при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения (29,32 г, выход 88,96%) в виде коричневого масла. МС (m/z): 256 (M+1).

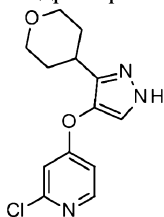
Способ 2. К раствору 2-хлорпиридин-4-ола (6,40 г, 48,42 ммоль) в ацетоне (150 мл) добавляют 2-бром-1-тетрагидропиран-4-илэтанон (10,03 г, 48,42 ммоль) и карбонат калия (10,14 г, 72,62 ммоль) и полученную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Фильтруют для удаления твердого вещества и указанное твердое вещество промывают ДХМ. Указанный фильтрат концентрируют при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения в количественном отношении. МС (m/z): 256 (M+1).

Следующие соединения получают, по существу, при помощи способа 2 согласно примеру получения 6.

Таблица 3

№ примера получения	Химическое наименование	Структура	Физические данные МС (m/z)
7	1-[(2-хлор-4-пиридил)окси]бутан-2-он		200 (M+1)
8	2-[(2-хлор-4-пиридил)окси]-1-тетрагидрофуран-3-илэтанон		242 (M+1)
9	1-[(2-хлор-4-пиридил)окси]-3,3-диметилбутан-2-он		228 (M+1)
10	2-[(2-хлор-4-пиридил)окси]-1-циклобутилэтанон		226 (M+1)
11	2-[(2-хлор-4-пиридил)окси]-1-циклопропилэтанон		212 (M+1)
12	2-[(2-хлор-4-пиридил)окси]-1-(2-пиридил)этанон		249 (M+1)

Пример получения 13. 2-Хлор-4-[(3-тетрагидропиран-4-ил-1Н-пиразол-4-ил)окси]пиридин



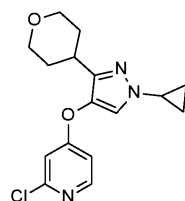
Смесь 2-[(2-хлор-4-пиридил)окси]-1-тетрагидропиран-4-илэтанона (29,3 г, 114,59 ммоль) и 1,1-диметокси-N,N-диметилметанамина (65 мл, 486,83 ммоль) перемешивают при 100°C в течение двух часов. Охлаждают до комнатной температуры, концентрируют при пониженном давлении и указанный остаток растворяют в EtOAc (400 мл). Промывают водой (100 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (100 мл). Сушат над безводным сульфатом натрия и концентрируют при пониженном давлении с получением коричневого твердого вещества. Растворяют в уксусной кислоте (350 мл) и охлаждают до 0°C. Добавляют моногидрат гидразина (16,8 мл, 345,66 ммоль) и перемешивают при комнатной температуре в течение ночи в атмосфере азота. Указанную смесь наливают в смесь лед/вода (250 мл) и подвергают экстракции посредством EtOAc (4×200 мл). Органические слои объединяют и промывают водой (200 мл), насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (100 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (100 мл). Сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют и указанный фильтрат концентрируют при пониженном давлении с получением масла коричневого цвета. Указанное коричневое масло очищают с применением слоя силикагеля путем элюирования EtOAc. Соответствующие фракции объединяют и концентрируют при пониженном давлении. Сушат в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (24,43 г, выход 76,22%) в виде желтого твердого вещества. МС (m/z): 280 (M+1).

Следующие соединения получают, по существу, при помощи способа согласно примеру получения 13.

Таблица 4

№ получения	Химическое наименование	Структура	Физические данные МС (m/z)
14	2-хлор-4-[(3-этил-1Н-пиразол-4-ил)окси]пиридин		224 (M+1)
15	2-хлор-4-[(3-тетрагидрофуран-3-ил-1Н-пиразол-4-ил)окси]пиридин		266 (M+1)
16	4-[(3-трет-бутил-1Н-пиразол-4-ил)окси]-2-хлорпиридин		252 (M+1)
17	2-хлор-4-[(3-циклобутил-1Н-пиразол-4-ил)окси]пиридин		250 (M+1)
18	2-хлор-4-[(3-циклопропил-1Н-пиразол-4-ил)окси]пиридин		236 (M+1)
19	2-хлор-4-[[3-(2-пиридил)-1Н-пиразол-4-ил]окси]пиридин		273 (M+1)

Пример получения 20. 2-Хлор-4-(1-циклопропил-3-тетрагидропиран-4-илпиразол-4-ил)оксипиридин



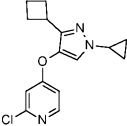
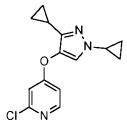
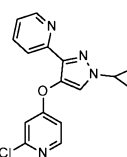
Способ 1. Смесь 2,2'-бипиридина (13,73 г, 87,90 ммоль) и ацетата меди (II) (15,97 г, 87,90 ммоль) в 1,2-дихлорэтане (244,3 мл) нагревают с обратным холодильником при 75°C в течение 25 мин и далее охлаждают до комнатной температуры. Добавляют раствор 2-хлор-4-[(3-тетрагидропиран-4-ил-1Н-пиразол-4-ил)окси]пиридина (24,43 г, 79,91 ммоль) в 1,2-дихлорэтане (335,30 мл), далее добавляют циклопропилбороновую кислоту (13,73 г, 159,82 ммоль) и карбонат натрия (16,94 г, 159,82 ммоль). Указанную реакционную смесь нагревают при 75°C в течение двух часов в атмосфере кислорода и охлаждают до комнатной температуры. Разбавляют EtOAc (200 мл), фильтруют через слой силикагеля и промывают EtOAc (250 мл). Указанный фильтрат промывают водой (200 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (200 мл). Сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют и указанный фильтрат концентрируют при пониженном давлении, и указанный остаток высушивают в вакууме при комнатной температуре в течение ночи. Очищают при помощи колоночной хроматографии на силикагеле с 6-27% EtOAc в ДХМ с получением указанного в заголовке соединения (20,75 г, выход 81,2%) в виде желтого твердого вещества. МС (m/z): 320 (M+1).

Способ 2. Суспензию 2,2'-бипиридина (28,8 г, 56,5 ммоль) и ацетата меди (II) (8,2 г, 45,2 ммоль) в 1,2-дихлорэтане (50 мл) нагревают до 70°C и продувают азотом в течение 3 мин. Фильтруют и указанный фильтрат добавляют к смеси 2-хлор-4-[(3-тетрагидропиран-4-ил-1Н-пиразол-4-ил)окси]пиридина (8 г, 22,6 ммоль), циклопропил(трифтор)бората калия (6,7 г, 45,2 ммоль) и карбоната натрия (4,8 г, 45,2 ммоль) в 1,2-дихлорэтане (50 мл). Указанную реакционную смесь нагревают при 70°C в течение четырех дней. Охлаждают до комнатной температуры. Фильтруют и промывают ДХМ. Указанный фильтрат промывают насыщенным водным раствором хлорида аммония и насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют и указанный фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Очищают при помощи колоночной хроматографии на силикагеле с 1-10%

MeOH в ДХМ с получением указанного в заголовке соединения (6,0 г, выход 82,2%). МС (m/z): 320 (M+1).

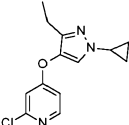
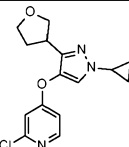
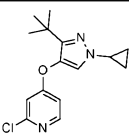
Следующие соединения получают, по существу, при помощи способа 1 согласно примеру получения 20. Указано изменение в процедуре выделения продукта реакции.

Таблица 5

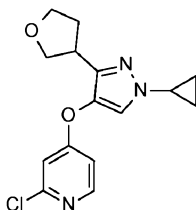
№ примера получения	Химическое наименование	Структура	Физические данные МС (m/z)	Примечание
21	2-хлор-4-(3-циклобутил-1-циклопропилпиразол-4-ил)оксипиридин		290 (M+1)	
22	2-хлор-4-(1,3-дициклопропилпиразол-4-ил)оксипиридин		276 (M+1)	
23	2-хлор-4-[1-циклопропил-3-(2-пиридил)пиразол-4-ил]оксипиридин		313 (M+1)	Применяют 23% гидроксид аммония в воде, чтобы погасить указанную реакцию.

Следующие соединения получают, по существу, при помощи способа 2 согласно примеру получения 20.

Таблица 6

№ примера получения	Химическое наименование	Структура	Физические данные МС (m/z)
24	2-хлор-4-(1-циклопропил-3-этилпиразол-4-ил)оксипиридин		264 (M+1)
25	2-хлор-4-(1-циклопропил-3-тетрагидрофуран-3-илпиразол-4-ил)оксипиридин		306 (M+1)
26	4-(3- <i>tert</i> -бутил-1-циклопропилпиразол-4-ил)окси-2-хлорпиридин		292 (M+1)

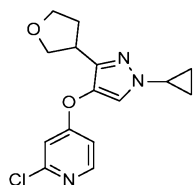
Пример получения 27. 2-Хлор-4-(1-циклопропил-3-тетрагидрофуран-3-илпиразол-4-ил)оксипиридин, изомер 1



Рацемическую смесь 2-хлор-4-(1-циклопропил-3-тетрагидрофуран-3-илпиразол-4-ил)оксипиридина (пример получения 25) очищают при помощи хиральной хроматографии с получением первого элюирующего энантиомера в качестве указанного в заголовке соединения. МС (m/z): 306 (M+1).

Условия очистки: CHIRALPAK® IC; подвижная фаза: 20% этанола (EtOH) в диоксиде углерода; скорость потока: 300 г/мин; УФВ: 240 нм; время удерживания: 2,44 мин.

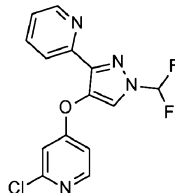
Пример получения 28. 2-Хлор-4-(1-циклопропил-3-тетрагидрофуран-3-илпиразол-4-ил)оксипиридин, изомер 2



Рацемическую смесь 2-хлор-4-(1-циклопропил-3-тетрагидрофуран-3-илпиразол-4-ил)оксипиридина (пример получения 25) очищают при помощи хиральной хроматографии с получением второго элюирующего энантиомера в качестве указанного в заголовке соединения. МС (m/z): 306 (M+1).

Условия очистки: CHIRALPAK® IC; подвижная фаза: 20% этанола (EtOH) в диоксиде углерода; скорость потока: 300 г/мин; УФВ: 240 нм; время удерживания: 2,93 мин.

Пример получения 29. 2-Хлор-4-[1-(дифторметил)-3-(2-пиридил)пиразол-4-ил]оксипиридин



На ледяной бане охлаждают раствор 2-хлор-4-[[3-(2-пиридил)-1H-пиразол-4-ил]окси]пиридина (2,0 г, 7,33 ммоль) в ДМФА (73,34 мл) и порционно добавляют гидрид натрия (60% в минеральном масле, 880,02 мг, 22,00 ммоль). Указанную смесь перемешивают при 0°C в течение 10 мин, позволяют ей нагреться до комнатной температуры и перемешивают в течение 10 мин. Добавляют дифториодметан (10 мас.% в ТГФ, 27,19 мл, 36,67 ммоль) и указанную реакционную смесь перемешивают при 45°C в течение ночи. Охлаждают до комнатной температуры и разбавляют EtOAc. Промывают 5% водным раствором хлорида лития и далее промывают насыщенным водным раствором хлорида натрия. Сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют и указанный фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Указанный остаток очищают при помощи колоночной хроматографии на силикагеле с 0-50% EtOAc в ДХМ. Соответствующие фракции объединяют и концентрируют при пониженном давлении. Указанный остаток очищают при помощи колоночной хроматографией на силикагеле с 0-10% EtOAc в ДХМ с получением указанного в заголовке соединения (1,56 г, выход 65,9%). МС (m/z): 323 (M+1).

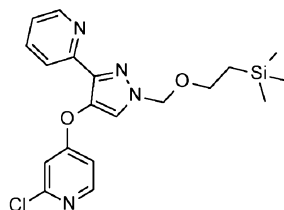
Следующие соединения получают, по существу, при помощи способа согласно примеру получения 29. Указаны изменения в растворителе, основании и/или температуре реакции.

Таблица 7

№ примера получения	Химическое наименование	Структура	Физические данные	Примечание
30	2-хлор-4-[3-циклопропил-1-(дифторметил)пиразол-4-ил]оксипиридин		МС (m/z): 286 (M+1)	ТГФ, <i>трет</i> -бутоксид калия
31	2-хлор-4-[1-(дифторметил)-3-тетрагидропиран-4-илпиразол-4-ил]оксипиридин		¹ H-ЯМР (399,83 МГц, ДМСО- <i>d</i> ₆) δ 8,42 (s, 1H), 8,30 (d, J=5,6 Гц, 1H), 7,71 (t, J=59,2 Гц, 1H), 7,15 (d, J=2,4 Гц, 1H), 7,04 (dd, J=2,4 Гц, J=5,6 Гц, 1H), 3,81 (m, 2H), 3,33 (m, 2H), 2,80 (m, 1H), 1,64 (m, 4H).	

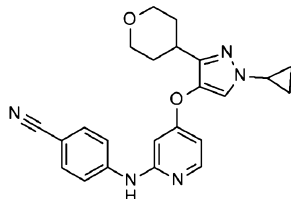
32	2-хлор-4-[1-(дифторметил)-3-тетрагидрофуран-3-илпиразол-4-ил]оксипиридин		¹ H-ЯМР (399,83 МГц, ДМСО- <i>d</i> ₆) δ 8,46 (s, 1H), 8,30 (d, J=5,6 Гц, 1H), 7,71 (t, J=59,2 Гц, 1H), 7,16 (d, J=2,4 Гц, 1H), 7,05 (dd, J=2,4 Гц, J=5,6 Гц, 1H), 3,89 (t, J=6,0 Гц, 1H), 3,68 (m, 3H), 3,26 (m, 1H), 2,12 (m, 1H), 1,99 (m, 1H).	
33	2-хлор-4-[3-циклобутил-1-(дифторметил)пиразол-4-ил]оксипиридин		МС (m/z): 300 (M+1)	
34	2-хлор-4-[1-изопропил-3-(2-пиридил)пиразол-4-ил]оксипиридин		МС (m/z): 315 (M+1)	ТГФ, трет-бутоксид калия, нагревание с обратным холодильником в течение ночи
35	2-хлор-4-(3-циклопропил-1-изопропилпиразол-4-ил)оксипиридин		МС (m/z): 278 (M+1)	комнатная температура
36	2-хлор-4-(1-изопропил-3-тетрагидропиран-4-илпиразол-4-ил)оксипиридин		МС (m/z): 322 (M+1)	комнатная температура
37	2-хлор-4-(3-циклобутил-1-изопропилпиразол-4-ил)оксипиридин		МС (m/z): 292 (M+1)	комнатная температура
38	2-хлор-4-[1-(2,2-дифторэтил)-3-(2-пиридил)пиразол-4-ил]оксипиридин		МС (m/z): 337 (M+1)	ТГФ, трет-бутоксид калия, 50°C
39	2-хлор-4-[3-циклопропил-1-(2,2-дифторэтил)пиразол-4-ил]оксипиридин		МС (m/z): 300 (M+1)	карбонат цезия, 50°C
40	2-хлор-4-[1-(2,2-дифторэтил)-3-тетрагидропиран-4-илпиразол-4-ил]оксипиридин		МС (m/z): 344 (M+1)	карбонат цезия, 50°C

Пример получения 41. 2-Хлор-4-{[3-(пиридин-2-ил)-1-{2-(триметилсилил)этокси]метил}-1Н-пирозол-4-ил]окси}пиридин



К раствору 2-хлор-4-[[3-(2-пиридил)-1Н-пиразол-4-ил]окси]пиридина (3,0 г, 11,00 ммоль) в ТГФ (110 мл) добавляют гидрид натрия (60% суспензия в минеральном масле, 484 мг, 12,10 ммоль) при 0°C. Перемешивают в течение 15 мин при 0°C и добавляют 2-(триметилсилил)этоксиметилхлорид (2,02 г, 12,10 ммоль). Указанную реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Указанную смесь концентрируют. Указанный остаток распределяют между ДХМ и водой. Органический слой отделяют и сушат над сульфатом натрия. Указанную смесь фильтруют и указанный фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Указанный остаток очищают при помощи колоночной хроматографии на силикагеле с 0-30% EtOAc в гексане с получением указанного в заголовке соединения (3,64 г, выход 82,1%). МС (m/z): 403 (M+1).

Пример получения 42. 4-[[4-(1-Циклопропил-3-тетрагидропиран-4-ил-пиразол-4-ил)окси-2-пиридил]амино]бензонитрил



Раствор 2-хлор-4-(1-циклопропил-3-тетрагидропиран-4-илпиразол-4-ил)оксипиридина (400 мг, 1,2 ммоль), п-аминобензонитрила (219,9 мг, 1,9 ммоль), карбоната цезия (568,5 мг, 1,7 ммоль), 4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантена (134,6 мг, 0,23 ммоль) в 1,4-диоксане (15 мл) продувают азотом в течение 5 мин. Полученную смесь обрабатывают ацетатом палладия (II) (26,1 мг, 0,12 ммоль) и продувают азотом в течение 5 мин. Флакон закрывают и перемешивают при 100°C в течение двух часов и далее при 80°C в течение выходных. Охлаждают до комнатной температуры, фильтруют через слой CELITE® и промывают 5% MeOH в ДХМ. Указанный фильтрат концентрируют с получением указанного в заголовке соединения (467 мг, выход 100%). МС (m/z): 402 (M+1).

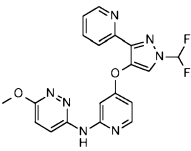
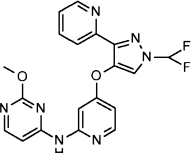
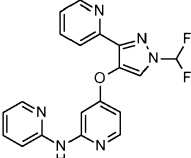
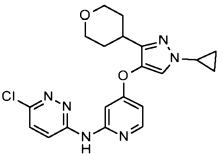
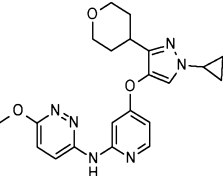
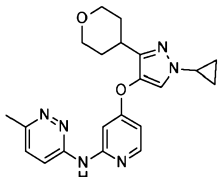
Следующие соединения получают, по существу, при помощи способа согласно примеру получения 42. Указаны изменения в катализаторе и/или растворителе.

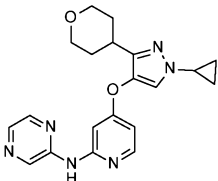
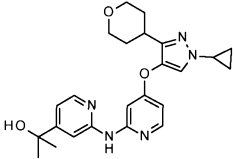
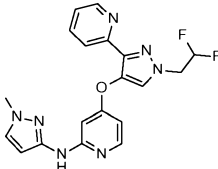
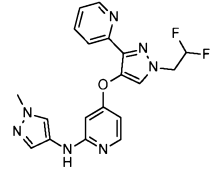
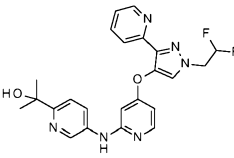
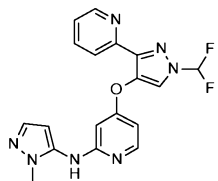
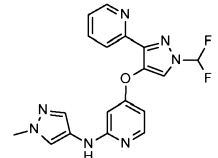
Таблица 8

№ примера получения	Химическое наименование	Структура	Физические данные МС (m/z)	Примечание
---------------------	-------------------------	-----------	----------------------------	------------

43	2-[5-[[4-[3-(2-пиридил)-1-(2-триметилсилилэтоксиметил)пиразол-4-ил]окси-2-пиридил]амино]-2-пиридил]пропан-2-ол		519 (M+1)	трис(добензилденацетон)дипалладий (0), толуол
44	Метил-4-[[4-(3-циклопропил-1-изопропилпиразол-4-ил)окси-2-пиридил]амино]пиридин-2-карбоксилат		394 (M+1)	трис(добензилденацетон)дипалладий (0), толуол
45	4-[[4-[1-изопропил-3-(2-пиридил)пиразол-4-ил]окси-2-пиридил]амино]бензонитрил		397 (M+1)	
46	3-[[4-(1-циклопропил-3-тетрагидропиран-4-илпиразол-4-ил)окси-2-пиридил]амино]бензонитрил		402 (M+1)	
47	4-[[4-(1-циклопропил-3-этил-пиразол-4-ил)окси-2-пиридил]амино]бензонитрил		346 (M+1)	
48	4-[[4-[1-(диформетил)-3-тетрагидропиран-4-илпиразол-4-ил]окси-2-пиридил]амино]бензонитрил		412 (M+1)	
49	N-[4-[1-(диформетил)-3-тетрагидрофуран-3-илпиразол-4-ил]окси-2-пиридил]пиридазин-3-амин		375 (M+1)	трис(добензилденацетон)дипалладий (0)
50	2-[4-[[4-(1-циклопропил-3-тетрагидрофуран-3-илпиразол-4-ил)окси-2-пиридил]амино]-2-пиридил]пропан-2-ол		422 (M+1)	
51	4-[[4-[3-циклобутил-1-(диформетил)пиразол-4-ил]окси-2-пиридил]амино]бензонитрил		382 (M+1)	
52	3-[[4-[1-(диформетил)-3-(2-пиридил)пиразол-4-ил]окси-2-пиридил]амино]бензонитрил		405 (M+1)	
53	4-[[4-(1,3-дициклопропилпиразол-4-ил)окси-2-пиридил]амино]бензонитрил		358 (M+1)	

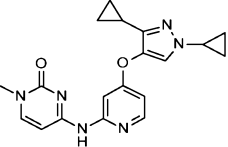
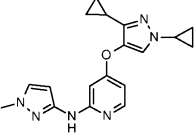
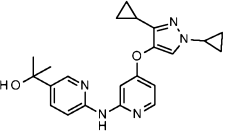
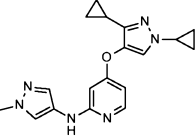
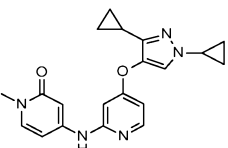
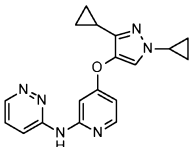
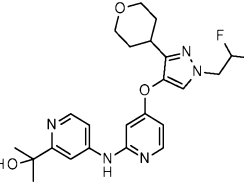
Пример 1. 2-{4-[[4-{1-Циклопропил-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси} пири-

			МС (m/z)	
2	N-(4-{[1-(диформетил)-3-(пиридин-2-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)-6-метоксипиридазин-3-амин		412 (M+1)	бис(дипбензилиде нацетон)паллади й
3	N-(4-{[1-(диформетил)-3-(пиридин-2-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)-2-метоксипиримидин-4-амин		412 (M+1)	бис(дипбензилиде нацетон)паллади й
4	4-{[1-(диформетил)-3-(пиридин-2-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}-N-(пиридин-2-ил)пиридин-2-амин		381 (M+1)	
5	6-хлор-N-(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)пиридазин-3-амин		413 (M+1)	
6	N-(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)-6-метоксипиридазин-3-амин		409 (M+1)	
7	N-(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)-6-метилпиридазин-3-амин		393 (M+1)	

8	N-(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)пиразин-2-амин		379 (M+1)	
9	2-{2-[(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-4-ил}пропан-2-ол		436 (M+1)	
10	4-{[1-(2,2-дифторэтил)-3-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}-N-(1-метил-1H-пиразол-3-ил)пиридин-2-амин		398 (M+1)	фенолят натрия, бис(дипенилиде нафтон)паллади й
11	4-{[1-(2,2-дифторэтил)-3-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}-N-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)пиридин-2-амин		398 (M+1)	фенолят натрия, бис(дипенилиде нафтон)паллади й
12	2-{5-[(4-{[1-(2,2-дифторэтил)-3-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		453 (M+1)	фенолят натрия, бис(дипенилиде нафтон)паллади й
13	4-{[1-(диформетил)-3-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}-N-(1-метил-1H-пиразол-5-ил)пиридин-2-амин		384 (M+1)	бис(дипенилиде нафтон)паллади й
14	4-{[1-(диформетил)-3-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}-N-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)пиридин-2-амин		384 (M+1)	бис(дипенилиде нафтон)паллади й

15	N-(4-{[1-(дифторметил)-3-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)пиридазин-3-амин		382 (M+1)	бис(дибензилиде нацетон)паллади й
16	2-{6-[(4-{[1-циклопропил-3-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-3-ил}пропан-2-ол		429 (M+1)	
17	2-{5-[(4-{[1-циклопропил-3-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		429 (M+1)	
18	2-{4-[(4-{[1-циклопропил-3-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		429 (M+1)	
19	2-{6-[(4-{[1-(пропан-2-ил)-3-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-3-ил}пропан-2-ол		431 (M+1)	фенолят натрия, бис(дибензилиде нацетон)паллади й
20	1-метил-4-[(4-{[1-(пропан-2-ил)-3-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2(1H)-он		403 (M+1)	
21	N-(4-{[1-(пропан-2-ил)-3-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)пиридазин-3-амин		374 (M+1)	

22	N-{4-[(3- <i>трет</i> -бутил-1-циклопропил-1H-пиразол-4-ил)окси]пиридин-2-ил}пиридазин-3-амин		351 (M+1)	
23	2-[5-({4-[(3- <i>трет</i> -бутил-1-циклопропил-1H-пиразол-4-ил)окси]пиридин-2-ил}амино)пиридин-2-ил]пропан-2-ол		408 (M+1)	
24	2-[4-({4-[(3- <i>трет</i> -бутил-1-циклопропил-1H-пиразол-4-ил)окси]пиридин-2-ил}амино)пиридин-2-ил]пропан-2-ол		408 (M+1)	
25	2-[4-({4-[(1-циклопропил-3-этил-1H-пиразол-4-ил)окси]пиридин-2-ил}амино)пиридин-2-ил]пропан-2-ол		380 (M+1)	
26	4-{[3-циклопропил-1-(дифторметил)-1H-пиразол-4-ил]окси}-N-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)пиридин-2-амин		347 (M+1)	бис(дипбензилиде нацетон)паллади й
27	2-{4-[(4-{[3-циклопропил-1-(2,2-дифторэтил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		416 (M+1)	фенолят натрия, бис(дипбензилиде нацетон)паллади й
28	N-(4-{[3-циклопропил-1-(дифторметил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)пиридазин-3-амин		345 (M+1)	бис(дипбензилиде нацетон)паллади й

29	4-({4-[(1,3-дициклопропил-1Н-пиразол-4-ил)окси]пиридин-2-ил}амино)-1-метилпиримидин-2(1Н)-он		365 (M+1)	
30	4-[(1,3-дициклопропил-1Н-пиразол-4-ил)окси]-N-(1-метил-1Н-пиразол-3-ил)пиридин-2-амин		337 (M+1)	
31	2-[6-({4-[(1,3-дициклопропил-1Н-пиразол-4-ил)окси]пиридин-2-ил}амино)пиридин-3-ил]пропан-2-ол		392 (M+1)	фенолят натрия, бис(дибензилиде нацетон)палладий
32	4-[(1,3-дициклопропил-1Н-пиразол-4-ил)окси]-N-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)пиридин-2-амин		337 (M+1)	фенолят натрия, бис(дибензилиде нацетон)палладий
33	4-({4-[(1,3-дициклопропил-1Н-пиразол-4-ил)окси]пиридин-2-ил}амино)-1-метилпиридин-2(1Н)-он		364 (M+1)	бис(дибензилиде нацетон)палладий, толуол/N-метилпирролидон
34	N-{4-[(1,3-дициклопропил-1Н-пиразол-4-ил)окси]пиридин-2-ил}пиридазин-3-амин		335 (M+1)	
35	2-{4-[(4-{[1-(2,2-дифторэтил)-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		460 (M+1)	фенолят натрия, бис(дибензилиде нацетон)палладий

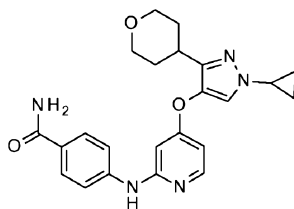
36	N-(4-{[1-(диформетил)-3-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)пиридазин-3-амин		389 (M+1)	бис(дибензилиде нацетон)паллади й
37	4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}-N-(1-метил-1H-пиразол-5-ил)пиридин-2-амин		381 (M+1)	бис(дибензилиде нацетон)паллади й
38	4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}-N-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)пиридин-2-амин		381 (M+1)	бис(дибензилиде нацетон)паллади й
39	4-[(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]-1-метилпиридин-2(1H)-он		408 (M+1)	
40	N-(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)пиридазин-3-амин		379 (M+1)	
41	4-[(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидрофуран-3-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]-1-метилпиридин-2(1H)-он		394 (M+1)	
42	N-[4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидрофуран-3-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил]пиридазин-3-амин, изомер 2		365 (M+1)	

43	N-[4-({1-циклопропил-3-(тетрагидрофуран-3-ил)-1H-пиразол-4-ил}окси)пиридин-2-ил]пиридазин-3-амин, изомер 1		365 (M+1)	
44	2-{5-[(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидрофуран-3-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		422 (M+1)	фенолят натрия, бис(дибензилиде нацетон)паллади й
45	2-{5-[(4-{[3-циклобутил-1-(дифторметил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		416 (M+1)	
46	2-[5-({4-[(3-циклобутил-1-циклопропил-1H-пиразол-4-ил)окси]пиридин-2-ил}амино)пиридин-2-ил]пропан-2-ол		406 (M+1)	
47	2-{5-[(4-{[1-(дифторметил)-3-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		439 (M+1)	
48	2-{4-[(4-{[1-(дифторметил)-3-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		439 (M+1)	
49	2-{5-[(4-{[1-(пропан-2-ил)-3-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		431 (M+1)	

50	2-{4-[(4-{[1-(пропан-2-ил)-3-(пиридин-2-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		431 (M+1)	
51	2-{5-[(4-{[3-циклопропил-1-(дифторметил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		402 (M+1)	
52	2-{4-[(4-{[3-циклопропил-1-(дифторметил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		402 (M+1)	
53	2-[5-(4-{[1,3-дициклопропил-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		392 (M+1)	
54	2-[4-(4-{[1,3-дициклопропил-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		392 (M+1)	фенолят натрия, бис(дибензилиде нацетон)паллади й
55	2-{5-[(4-{[3-циклопропил-1-(пропан-2-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		394 (M+1)	фенолят натрия, бис(дибензилиде нацетон)паллади й
56	2-{5-[(4-{[1-(дифторметил)-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		446 (M+1)	

57	2-{4-[(4-{[1-(дифторметил)-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		446 (M+1)	
58	2-{5-[(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		436 (M+1)	
59	2-{4-[(4-{[1-(пропан-2-ил)-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		438 (M+1)	
60	2-[4-(4-{[3-циклобутил-1-циклопропил-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		406 (M+1)	бис(дибензилиде нацетон)паллади й
61	2-{4-[(4-{[3-циклобутил-1-(пропан-2-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол		408 (M+1)	

Пример 62. 4-[(4-{[1-Циклопропил-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]бензамид



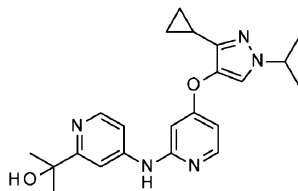
К раствору 4-[[4-(1-циклопропил-3-тетрагидропиран-4-илпиразол-4-ил)окси-2-пиридил]амино]бензонитрила (467 мг, 1,16 ммоль) в ДМСО (5 мл) добавляют карбонат калия (80,4 мг, 0,58 ммоль). Добавляют 30% перекиси водорода (1,77 мл, 17,45 ммоль) и указанную реакционную смесь перемешивают при температуре окружающей среды в течение ночи. Разбавляют водой и четыре раза подвергают экстракции посредством ДХМ. Органические слои объединяют и промывают насыщенным водным раствором хлорида натрия. Сушат над безводным сульфатом натрия. Указанную смесь фильтруют и указанный фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Указанный остаток очищают при помощи хроматографии с обращенной фазой (высокопроизводительная колонка C18 Redisep Rf Gold с обращенной фазой, 0-100% муравьиная кислота/ACN в смеси муравьиная кислота/вода) с получением указанного в заголовке соединения (220 мг, выход 45,9%). МС (m/z): 420 (M+1).

Следующие соединения получают, по существу, при помощи способа согласно примеру 62.

Таблица 10

№ примера	Химическое наименование	Структура	Физические данные МС (m/z)
63	3-[(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]бензамид		420 (M+1)
64	3-[(4-{[1-(пропан-2-ил)-3-(пиридин-2-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]бензамид		415 (M+1)
65	4-({4-[(1-циклопропил-3-этил-1Н-пиразол-4-ил)окси]пиридин-2-ил}амино)бензамид		364 (M+1)
66	4-[(4-{[1-(диформетил)-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]бензамид		430 (M+1)
67	4-[(4-{[3-циклобутил-1-(диформетил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]бензамид		400 (M+1)
68	3-[(4-{[1-(диформетил)-3-(пиридин-2-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]бензамид		423 (M+1)
69	4-({4-[(1,3-дициклопропил-1Н-пиразол-4-ил)окси]пиридин-2-ил}амино)бензамид		376 (M+1)

Пример 70. 2-{4-[(4-{[3-Циклопропил-1-(пропан-2-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил} пропан-2-ол

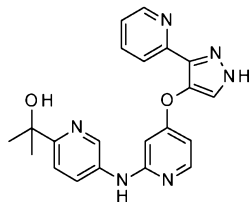


Раствор метил-4-[[4-(3-циклопропил-1-изопропилпиразол-4-ил)окси-2-пиридил]амино]пиридин-2-карбоксилата (298 мг, 0,76 ммоль) в ТГФ (6 мл) в герметично закрытом сосуде продувают азотом. По каплям добавляют метилмагнийбромид (3М в диэтиловом эфире, 1,01 мл, 3,03 ммоль) и указанную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение двух часов. Указанную смесь концентрируют при пониженном давлении и указанный остаток разбавляют с помощью ДХМ и насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Органический слой отделяют и водный слой подвергают экстракции посредством ДХМ. Органические слои объединяют и промывают насыщенным водным раствором хлорида натрия. Сушат над сульфатом натрия, фильтруют и указанный фильтрат концентрируют. Очищают при помощи колоночной хроматографии на силикагеле

с 5-10% MeOH в ДХМ с получением указанного в заголовке соединения (160 мг, выход 53,69%). МС (m/z): 394 (M+1).

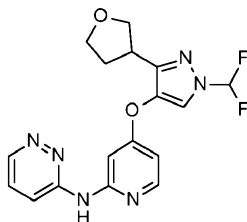
Пример 71. 2-{5-[(4-{[3-(Пиридин-2-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-

ил}пропан-2-ол



Раствор 2-[5-[[4-[3-(2-пиридил)-1-(2-триметилсилилэтоксиметил)пиразол-4-ил]окси-2-пиридил]амино]-2-пиридил]пропан-2-ола (500 мг, 0,96 ммоль) в трифторуксусной кислоте (3 мл) охлаждают до 0°C на ледяной бане. Добавляют триэтилсилан (1 мл, 6,24 ммоль). Указанную реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Концентрируют и указанный остаток очищают при помощи хроматографии с обращенной фазой (высокопроизводительная колонка C18 Redisep Rf Gold с обращенной фазой, 0-100% 10 mM бикарбоната аммония в ACN). Соответствующие фракции концентрируют для удаления ACN. Указанную оставшуюся водную смесь подвергают экстракции посредством ДХМ, органический слой отделяют и сушат над сульфатом натрия. Фильтруют и указанный фильтрат концентрируют при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения (168 мг, выход 44,9%). МС (m/z): 389 (M+1).

Пример 72. N-[4-({1-(Дифторметил)-3-(тетрагидрофуран-3-ил)-1H-пиразол-4-ил}окси)пиридин-2-ил]пиридазин-3-амин, изомер 1



Рацемическую смесь N-[4-[1-(дифторметил)-3-тетрагидрофуран-3-ил-пиразол-4-ил]окси-2-пиридил]пиридазин-3-амин (пример получения 49) очищают при помощи хиральной хроматографии с получением первого элюирующего энантиомера в качестве указанного в заголовке соединения. МС (m/z): 375 (M+1).

Условия очистки: CHIRALPAK® IC; подвижная фаза: 30% изопропанола, содержащего изопропиламин в диоксиде углерода; скорость потока: 70 г/мин; УФВ: 280 нм; время удерживания: 3,93 мин.

Следующие соединения получают, по существу, при помощи способа согласно примеру 72. Указаны альтернативные условия очистки.

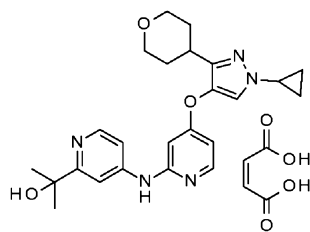
Таблица 11

№ примера	Химическое наименование	Структура	Условия	Физические данные
73	2-(5-{[4-({1-циклопропил-3-(тетрагидрофуран-3-ил)-1Н-пиразол-4-ил}окси)пиридин-2-ил]амино}пиридин-2-ил)пропан-2-ол, изомер 1		CHIRALCEL® OJ-H; Подвижная фаза: 20% EtOH в гептане; Скорость потока: 425 мл/мин; УФВ: 280 нм; Время удерживания: 17,39 минут	МС (m/z): 422 (M+1)
74	2-(5-{[4-({1-циклопропил-3-(тетрагидрофуран-3-ил)-1Н-пиразол-4-ил}окси)пиридин-2-ил]амино}пиридин-2-ил)пропан-2-ол, изомер 2		CHIRALCEL® OJ-H; Подвижная фаза: 20% EtOH в гептане; Скорость потока: 425 мл/мин; УФВ: 280 нм; Время удерживания: 21,55 минута	МС (m/z): 422 (M+1)
75	2-(4-{[4-({1-циклопропил-3-(тетрагидрофуран-3-ил)-1Н-пиразол-4-ил}окси)пиридин-2-ил]амино}пиридин-2-ил)пропан-2-ол, изомер 1		CHIRALCEL® OJ-H; Подвижная фаза: 20% изопропанола, содержащего 0,2% изопропиламина в диоксиде углерода; Скорость потока: 70 г/мин; УФВ: 225 нм; Время удерживания: 2,67 минуты	МС (m/z): 422 (M+1)
76	2-(4-{[4-({1-циклопропил-3-(тетрагидрофуран-3-ил)-1Н-пиразол-4-ил}окси)пиридин-2-ил]амино}пиридин-2-ил)пропан-2-ол, изомер 2		CHIRALCEL® OJ-H; Подвижная фаза: 20% изопропанола, содержащего 0,2% изопропиламина в диоксиде углерода; Скорость потока: 70 г/мин; УФВ: 225 нм; Время удерживания: 3,59 минуты	МС (m/z): 422 (M+1)

Процедура получения рентгеновских порошковых дифрактограмм примеров 77-79.

Дифрактограммы рентгеновской порошковой дифракции (XRD) твердых кристаллических веществ получают на рентгеновском порошковом дифрактометре Bruker D4 Endeavor, оснащенном CuKα источником ($\lambda=1,54060 \text{ \AA}$) и детектором Vantes, работающем при 35 кВ и 50 мА. Образец сканируют от 4 до 40° в 2θ с размером шага 0,009° в 2θ и скоростью сканирования 0,5 с/шаг и с 0,6 мм щелью расходимости, 5,28 мм фиксированной противорассеивающей щелью и 9,5 мм приемной щелью. Сухой порошок помещают в кварцевый держатель образца и получают гладкую поверхность при помощи предметного стекла. Рентгеновские дифрактограммы кристаллических форм получают при температуре окружающей среды и относительной влажности.

Пример 77. 2-{4-[(4-{[1-Циклопропил-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол, (2Z)-бут-2-ендиоат (1:1)



В ACN (2 мл) вносят 2-{4-[(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол (142 мг). Указанное твердое вещество полностью растворяется при перемешивании при 80°C/1000 оборотов в минуту. К полученному раствору добавляют малеиновую кислоту (48 мг, 1,20 эквивалента в 1 мл ACN при 80°C). Изначально указанная смесь является мутной, однако быстро становится прозрачным раствором. Нагревание и перемешивание прекращают. Указанный раствор охлаждают до комнатной температуры. Добавляют дополнительные 2 мл ACN для суспендирования твердого вещества. Указанное белое твердое вещество отделяют при помощи вакуумной фильтрации и твердое вещество сушат прямо на месте на фильтре в течение 15 мин в потоке воздуха. Полученное твердое вещество сушат в вакуумной печи при 65°C в течение ночи с получением указанного в заголовке соединения (132 мг, выход 73,4%). Теоретическое значение процентного содержания иона малеиновой кислоты в образовавшейся соли для моносоли составляет 21,0%. Анализ на содержание противоиона при помощи ВЭЖХ показывает, что фактическое значение процентного содержания иона малеиновой кислоты в образовавшейся соли составляет 17,2%. Анализ на содержание противоиона определяет моно соль.

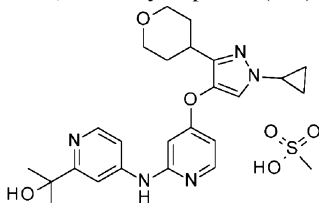
Рентгеновская порошковая дифракция примера 77.

Подготовленный образец из примера 77 характеризуется дифрактограммой рентгеновской порошковой дифракции (XRD), полученной с применением CuK α излучения, как имеющий дифракционные пики (значения в градусах 2-тета), описанные ниже в табл. 12, и, в частности, имеющий пики при 9,6° в сочетании с одним или более пиков, выбранных из группы, состоящей из 12,5, 17,5 и 16,9° с допустимым отклонением для углов дифракции 0,2°.

Таблица 12. Пики рентгеновской порошковой дифракции из примера 77

Пик	Угол (°2-тета) $\pm$ 0,2°	Относительная интенсивность (% от наиболее интенсивного пика)
1	9,6	100,0
2	12,5	88,2
3	17,5	74,4
4	16,9	55,8
5	12,9	54,0
6	20,1	45,9
7	21,5	44,1
8	19,2	36,4
9	20,9	35,5
10	23,5	32,0

Пример 78. 2-{4-[(4-{[1-Циклопропил-3-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол, метансульфонат (1:1)



В ацетон (2 мл) вносят 2-{4-[(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-1H-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол (113 мг).

Указанное твердое вещество полностью растворяется при перемешивании при 60°C/1000 оборотов в минуту. К полученному раствору добавляют метансульфоновую кислоту (21 мкл, 1,24 эквивалента). Нагревание и перемешивание прекращают. Указанный раствор охлаждают до комнатной температуры. Добавляют дополнительные 3 мл ацетона для суспендирования твердого вещества. Указанное белое твердое вещество отделяют при помощи вакуумной фильтрации и твердое вещество сушат прямо на месте на фильтре в течение 15 мин в потоке воздуха. Полученное твердое вещество сушат в вакуумной печи при 65°C в течение ночи с получением указанного в заголовке соединения (87 мг, выход 63,08%). Теоретическое значение процентного содержания иона метансульфоновой кислоты в образовавшейся соли для моносоли составляет 18,1%. Анализ на содержание противоиона при помощи ВЭЖХ показывает, что фактическое значение процентного содержания иона метансульфоновой кислоты в образовавшейся соли составляет 16,2%. Анализ на содержание противоиона определяет моно соль.

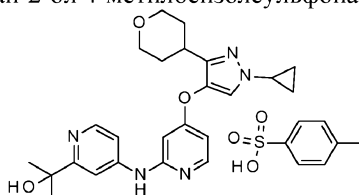
Рентгеновская порошковая дифракция примера 78.

Подготовленный образец из примера 78 характеризуется дифрактограммой рентгеновской порошковой дифракции (XRD), полученной с применением CuK α излучения, как имеющий дифракционные пики (значения в градусах 2-тета), описанные ниже в табл. 13, и, в частности, имеющий пики при 7,0° в сочетании с одним или более пиков, выбранных из группы, состоящей из 14,1, 10,8 и 18,6° с допустимым отклонением для углов дифракции 0,2°.

Таблица 13. Пики рентгеновской порошковой дифракции из примера 78

Пик	Угол (°2-тета)±0,2°	Относительная интенсивность (% от наиболее интенсивного пика)
1	7,0	100,0
2	14,1	93,2
3	10,8	73,6
4	18,6	66,1
5	15,9	61,4
6	19,7	60,7
7	5,4	49,2
8	7,9	49,1
9	4,5	48,1
10	17,8	47,6

Пример 79. 2-{4-[(4-{[1-Циклопропил-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол 4-метилбензолсульфонат (1:1)



В EtOAc (2 мл) вносят 2-{4-[(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол (122 мг). Указанное твердое вещество полностью растворяется при перемешивании при 80°C/1000 оборотов в минуту. К полученному раствору добавляют моногидрат п-толуолсульфоновой кислоты (1,23 эквивалента в 1 мл EtOAc при 80°C). Указанную смесь перемешивают при 80°C/1000 оборотов в минуту в течение 30 мин. Нагрев отключают и указанную смесь продолжают перемешивать при 1000 оборотах в минуту, чтобы она остыла до комнатной температуры. Полученное белое твердое вещество отделяют при помощи вакуумной фильтрации и твердое вещество сушат прямо на месте на фильтре в течение 15 мин в потоке воздуха. Полученное твердое вещество сушат в вакуумной печи при 65°C в течение ночи с получением указанного в заголовке соединения (159 мг, выход 93,40%). Теоретическое значение процентного содержания иона п-толуолсульфоновой кислоты в образовавшейся соли для моносоли составляет 29,3%. Анализ на содержание противоиона при помощи ВЭЖХ показывает, что фактическое значение процентного содержания иона п-толуолсульфоновой кислоты в образовавшейся соли составляет 28,3%. Анализ на содержание противоиона определяет моно соль.

Рентгеновская порошковая дифракция примера 79.

Подготовленный образец из примера 79 характеризуется дифрактограммой рентгеновской порошковой дифракции (XRD), полученной с применением CuK α излучения, как имеющий дифракционные пики (значения в градусах 2-тета), описанные ниже в табл. 14, и, в частности, имеющий пики при 17,8° в сочетании с одним или более пиков, выбранных из группы, состоящей из 19,7, 18,4 и 22,0° с допустимым отклонением для углов дифракции 0,2°.

Таблица 14. Пики рентгеновской порошковой дифракции из примера 79

Пик	Угол (°2-тета)±0,2°	Относительная интенсивность (% от наиболее интенсивного пика)
1	17,8	100,0
2	19,7	78,0
3	18,4	65,8
4	22,0	53,0
5	20,3	50,5
6	10,1	48,0
7	16,4	46,5
8	11,5	24,6
9	7,4	14,2
10	7,8	13,1

В нескольких случаях передачу сигналов посредством TGF β -пути связывали с прогрессированием рака и опухоли (Elliott и др. (2005) J. Clin. Oncol. 23:2078; Levy и др. (2006) Cytokine & Growth Factor Rev. 17:41-58). Существует несколько типов рака, при которых лиганды для TGF β , образуемые опухолью или стромой в микроокружении указанной опухоли, могут участвовать в прогрессировании опухоли. Клетки рака предстательной железы крысы MATLyLu (Steiner и Barrack (1992) Mol. Endocrinol. 6:15-25) и клетки

рака молочной железы человека MCF-7 (Arteaga и др. (1993) *Cell Growth and Differ.* 4:193-201) становились более онкогенными и метастатическими после трансфекции вектором, экспрессирующим TGF β 1 мышши. При раке предстательной железы человека и раке желудка поздней стадии уровень TGF β 1 был связан с ангиогенезом, метастазированием и неблагоприятным прогнозом (Wikstrom P. и др. (1998) *Prostate* 37:19-29; Saito H. и др. (1999) *Cancer* 86:1455-1462). При раке молочной железы неблагоприятный прогноз связывают с повышенным уровнем TGF β (Dickson и др. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:837-841; Kasid и др. (1987) *Cancer Res.* 47:5733-5738; Daly и др. (1990) *J. Cell Biochem.* 43:199-211; Barrett-Lee и др. (1990) *Br. J. Cancer* 61:612-617; King и др. (1989) *J. Steroid Biochem.* 34:133-138; Welch и др. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7678-7682; Walker и др. (1992) *Eur. J. Cancer* 238:641-644), а индукцию TGF β 1 при лечении тамоксифеном (Butta и др. (1992) *Cancer Res.* 52:4261-4264) связывали с неудачной попыткой лечения тамоксифеном при раке молочной железы (Thompson и др. (1991) *Br. J. Cancer* 63:609-614). Антитела по отношению к TGF β 1 ингибируют рост клеток рака молочной железы человека MDA-231 у бестимусных мышей (Arteaga и др. (1993) *J. Clin. Invest.* 92:2569-2576), лечение которых коррелирует с увеличением в селезенке активности естественных клеток-киллеров. Клетки CHO, трансфицированные латентным TGF β 1, также показали пониженную активность КК и повышенный рост опухоли у "голых" мышей (Wallick и др. (1990) *J. Exp. Med.* 172:1777-1784). Таким образом TGF β , секретируемый опухолями молочных желез, может вызвать супрессию эндокринного иммунитета. Было показано, что высокие концентрации TGF β 1 в плазме указывают на неблагоприятный прогноз в отношении пациентов с раком молочной железы поздней стадии (Anscher и др. (1993) *N. Engl. J. Med.* 328:1592-1598). Пациенты с высоким циркулирующим уровнем TGF β до высокой дозы химиотерапии и аутологичной трансплантации костного мозга подвержены высокому риску возникновения веноокклюзионной болезни печени (от 15 до 50% от числа всех пациентов с уровнем смертности до 50%) и идиопатического интерстициального пневмонита (от 40 до 60% от числа всех пациентов). Данные факты подразумевают, что 1) повышенные уровни TGF β в плазме можно применять для выявления пациентов с риском и 2) снижение в передаче сигналов TGF β может понизить заболеваемость и смертность при распространенных средствах для лечения пациентов с раком молочной железы.

В недавних публикациях также было предположено, что передача сигналов TGF β может иметь важное значение в стимулировании невосприимчивости опухолей к стандартным способам лечения, включая химиотерапии и рецепторные тирозинкиназы (WO 2012138783). В частности, при раке толстой кишки было показано, что специфичный профиль экспрессии генов выделяет группу пациентов, которые невосприимчивы к распространенной терапии первой линии. Данные опухолевые клетки восстанавливают восприимчивость к терапии в том случае, когда специфичный к TGF β R1 низкомолекулярный ингибитор блокирует TGF β -путь (Huang и др. (2012) *Cell* 151:937-950; Sadanandam и др. (2013) *Nat. Med.* 19:619-625; Vermeulen и др. (2013) *Nat. Med.* 19:614-618; Roepman и др. (2014) 134:552-562).

Миелодиспластические синдромы (MDS) представляют собой расстройства кроветворной системы в миелоидном отделе и характеризуются неэффективным образованием миелоидных клеток. MDS связан с изменениями в TGF β -пути, представленными пониженными уровнями SMAD7. SMAD7 представляет собой ингибирующий SMAD, который функционирует для ингибирования опосредованной TGF β передачи сигнала SMAD и расположен по ходу лиганд-активированной передачи сигнала посредством TGF β R1 и TGF β R2. Таким образом полагают, что гиперэкспрессия SMAD7 приводит к чрезмерной активации передачи сигнала TGF β при MDS, и реверсию данного фенотипа можно осуществить при помощи лечения низкомолекулярным ингибитором TGF β R1 (Zhou и др. (2011) *Cancer Res.* 71:955-963). Аналогичным образом в глиобластоме (GBM) уровни лиганда для TGF β повышены, и их связывают с прогрессированием заболевания. Было показано, что терапевтическое средство с антисмысловым олигонуклеотидом, AP1002, являлось потенциально активным в подгруппе пациентов с GBM (Bogdahn и др. (2011). *Curr. Pharm. Biotechnol.*). В меланоме активация сигнального пути TGF β также была связана с невосприимчивостью к ингибиторам BRAF и MEK (Sun и др. (2014) *Nature*. 508:118-122).

Многие злокачественные клетки секретируют трансформирующий фактор роста β (TGF β), мощный иммунодепрессант, тем самым предполагается, что выработка TGF β может представлять собой значимый механизм ухода опухоли от иммунного надзора хозяина (Flavell и др. (2010) *Nat. Rev. Immunol.* 10:554-567; Kast и др. (1999) *Leukemia* 13:1188-1199). Образование субпопуляции лейкоцитов с нарушенной передачей сигнала TGF β в хозяине с опухолью предлагает перспективное средство для иммунотерапии рака по отдельности или в комбинации с одним или более другими видами иммунотерапии, например, в комбинации с одним или более ингибиторами PD-1, такими как ниволумаб, пембролизумаб, ингибиторы PD-L1, противораковые вакцины и биспецифичные молекулы, вовлеченные в иммунные процессы, такие как ICScp100. Доклинически было показано, что лиганд TGF β , образуемый лимфоцитами, противодействует иммунному надзору опухоли (Donkor и др. (2012) *Development. Oncoimmunology* 1:162-171, Donkor и др. (2011) *Cytokine Immunity* 35:123-134); доклинически было показано, что нарушение данного канала обеспечивает противоопухолевое преимущество на мышинных моделях и *in vitro* (Zhong и др. (2010) *Cancer Res.* 16:1191-1205; Petrusch и др. (2009) *J. Immunol.* 183:3682-3689); Wakefield

и др. (2013) *Nat. Rev. Cancer* 13:328-341). Трансгенная животная модель с нарушенной передачей сигнала TGF β в Т-клетках способна к полному избавлению от обычно летальной опухоли лимфотической ткани, гиперэкспрессирующей TGF β , EL4 (Gorelik и Flavell, (2001) *Nature Medicine* 7(10): 1118-1122). Понижающая регуляция секреции TGF β в опухолевых клетках приводит к восстановлению иммуногенности у хозяина, в то время как Т-клеточная нечувствительность к TGF β приводит к ускоренной дифференциации и аутоиммунитету, элементы которого могут быть необходимы для борьбы с аутоантиген-экспрессирующими опухолями в организме толерантного хозяина. Иммунодепрессивные эффекты TGF β также наблюдались в субпопуляции пациентов с ВИЧ с более низким, нежели чем прогнозируемым, иммунным ответом в зависимости от числа их CD4/CD8 Т-клеток (Garba и др. *J. Immunology* (2002) 168:2247-2254). Нейтрализующее TGF β антитело было способно к реверсивным эффектам в культуре, указывая на то, что ингибиторы передачи сигналов TGF β , могут быть ценны при реверсии супрессии иммунного ответа, присутствующей в данной подгруппе пациентов с ВИЧ.

Во время самых ранних стадий канцерогенеза TGF β 1 может выступать в качестве мощного супрессора опухоли и может опосредовать действия некоторых химиопрофилактических агентов. Тем не менее в какой-то момент в ходе развития и прогрессирования злокачественных новообразований опухолевые клетки по всей видимости избегают зависимость от TGF β ингибирования роста параллельно с появлением в микроокружении биологически активного TGF β . Двойная роль TGF β вида супрессия опухоли/активация опухоли была наиболее ясно изучена на трансгенной системе гиперэкспрессии TGF β в кератиноцитах. В то время как трансгены были более устойчивы к образованию доброкачественных поражений кожи, скорость метастатического преобразования у трансгенов резко возрастала (Cui и др. (1996) *Cell* 86(4):531-42). Выработка TGF β 1 злокачественными клетками в первичных опухолях по всей видимости возрастает с усилением стадий прогрессирования опухоли. Исследования многих из основных типов эпителиальных раков позволяют предположить, что увеличенная выработка TGF β раковыми клетками человека происходит в относительно позднем случае во время прогрессирования опухоли. Кроме того, этот связанный с опухолью TGF β обеспечивает опухолевые клетки селективным преимуществом и способствует прогрессированию опухоли. Эффекты TGF β на взаимодействия вида клетка/клетка и клетка/строма приводят к более значительной способности к инвазии и метастазированию. Связанный с опухолью TGF β может позволить опухолевым клеткам уйти от иммунного надзора, так как он является мощным ингибитором клональной экспансии активированных лимфоцитов. Также было показано, что TGF β ингибирует выработку ангиостатина. Методы терапевтического воздействия на рак, такие как лучевая терапия и химиотерапия, индуцируют выработку активированного TGF β в опухоли, тем самым селектируя разрастание злокачественных клеток, невосприимчивых к ингибирующим эффектам роста TGF β . Таким образом, данные противораковые средства для лечения повышают риск и ускоряют развитие опухолей с усиленным ростом и инвазивностью. В данной ситуации агенты, нацеливающиеся на TGF β -опосредованную передачу сигнала, могут представлять собой очень эффективную терапевтическую стратегию. Было показано, что невосприимчивость опухолевых клеток к TGF β нивелирует большую часть цитотоксических эффектов лучевой терапии и химиотерапии, и зависимость от лечения активация TGF β в строме может даже быть вредной, так как это может сделать микроокружение более благоприятным для прогрессирования опухоли и способствовать повреждению тканей, приводящему к фиброзу. Вероятнее всего то, что разработка ингибиторов передачи сигнала TGF β будет благоприятствовать лечению прогрессивного рака отдельно и в сочетании с другими методами лечения.

Кроме того, в данной области техники известно, что передача сигнала TGF β участвует в фиброзных состояниях, таких как фиброз печени и хроническое заболевание почек. См., например, Ueha S. и др. 2012. *Front. Immunol.* 3:71. Cellular and molecular mechanisms of chronic inflammation-associated organ fibrosis; Bottinger и др. 2002. *J. Amer. Soc. Nephrol.* 13:2600. TGF- β Signaling in Renal Disease; Trachtman H. и др. 2011. *Kidney International* 79:1236. A phase 1, single-dose study of fresolimumab, an anti-TGF- β antibody, in treatment-resistant primary focal segmental glomerulosclerosis; и Rosenbloom J. и др. 2010. Narrative review: fibrotic diseases: cellular and molecular mechanisms and novel therapies. *Ann. Intern. Med.* 152:159-166.

Следующие анализы показывают, что приведенные в качестве примеров соединения ингибируют TGF β R1 при биохимическом анализе на клеточном уровне и в животной модели.

Биохимический анализ на определение активности TGF β R1.

Целью данного анализа *in vitro* является идентификация соединений, которые ингибируют TGF β R1. Очистка и экспрессия белка.

Вставку нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислоты от 200 до 503 TGF β R1 человека (NM_004612.2), с аминокислотой Thr, замененной на Asp в положении 204, осуществляют в вектор PFASTBACTM1 (Invitrogen, № по каталогу 10360-014) с N-концевой гистидиновой (HIS) меткой. Бакуловирус формируют согласно протоколу Системы Экспрессии Бакуловируса BAC-TO-BAC[®] (Invitrogen, № по каталогу 10359-016). Инфицируют клетки Sf9 в количестве $1,5 \times 10^6$ клеток/мл с применением

15 мл вируса P1 на литр культуры и инкубируют при 28°C в течение 48 ч. Проводят сбор клеток и хранение при -80°C для последующей очистки белка. Очистку белка проводят при 4°C. Осадки из 2 л культуры суспендируют в 100 мл буфера А (50 мМ Трис-НСl, pH 8, 200 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 5 мМ имидазола, 10% глицерина), содержащего 0,2% Тритона X-100 и полностью свободную от EDTA смесь ингибиторов протеаз Roche, и гомогенизируют. Указанные клеточные лизаты осветляют при помощи центрифугирования в роторе Bectman JA-18 в течение 45 мин при 16500 оборотах в минуту. Указанный супернатант инкубируют с 5 мл обладающей сродством к металлу смолы Ni-NTA (Qiagen) в течение трех часов. Указанную смолу упаковывают на колонке и промывают буфером А. Белок His-TGFβR1 (200-503)(T204D) элюируют градиентом 0-400 мМ имидазола в буфере А. Накапливают и концентрируют His-TGFβR1 (200-503)(T204D), содержащий фракции, и загружают в колонку HiLoad в 16,600 Superdex 200 (GE Healthcare Bioscience). Указанную колонку элюируют буфером для хранения (50 мМ Трис-НСl, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ). Накапливают и концентрируют His-TGFβR1 (200-503)(T204D), содержащий фракции. Концентрацию указанного белка определяют при УФ280. Указанный белок распределяют аликвотами и хранят при -80°C.

Условия проведения TR-FRET анализа.

Осуществляют предварительную инкубацию соединений с рекомбинантным His-TGFβR1 (200-503)(T204D) и детекторным антителом Eu-анти-HIS (Invitrogen, № по каталогу PV5597) в черных планшетах с половинным объемом лунок. Из 1 мМ исходного раствора исследуемых соединений готовят серийные разведения в ДМСО. Проводят 3-кратные серийные разведения указанного маточного раствора в ДМСО, чтобы получить кривую разведения по десяти точкам с конечными значениями концентрации соединений, находящихся в пределах от 2 мкМ до 0,1 нМ. Конечная концентрация ДМСО в указанном анализе составляет 4%. Указанную реакцию инициируют добавлением киназного трейсера (Kinase Tracer 178, Life Technologies PR9080A, Invitrogen). После 45-60 мин снимают показания флуоресценции на планшете-ридере.

Подсчитывают процент ингибирования обработанных групп соединений по отношению к группе с минимальным ингибированием (исключительно ДМСО, необработанная). Вычисляют абсолютное значение IC₅₀, применяя 4-параметрическое нелинейное логистическое уравнение, где абсолютная IC₅₀ равна концентрации, вызывающей 50% ингибирование, с применением программного обеспечения для анализа данных ActivityBase. Результаты данных анализов показывают, что приведенные в качестве примеров соединения являются эффективными ингибиторами TGFβR1. Например, все приведенные в качестве примеров соединения демонстрируют значения IC₅₀ меньше, чем 1 мкМ. В частности IC₅₀ для примера 1 составляет 0,027 мкМ.

Анализ репортерного гена люциферазы в клетках для определения активности TGFβR1.

Целью данного анализа является идентификация соединений, которые селективно воздействуют на SMAD 2,3-зависимую экспрессию генов при проведении анализов в клетках, демонстрирующих ингибирование ими TGFβR1 на клеточном уровне.

Конструируют клетки HEK293 (ATCC, CRL-1573), чтобы осуществить экспрессию люциферазы светлячка из чувствительного к SMAD 2,3 промотора в ответ на стимуляцию TGFβ. Такую клеточную линию можно образовать путем инфицирования лентивирусными частицами (SA Biosciences) и селекции на устойчивость к пуromycin. Указанные клетки HEK_293SMAD 2/3 из готовых для анализа замороженных запасов высевали в количестве 15000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты в среду OPTI-MEM®, содержащую 10% фетальной бычьей сыворотки. Через 72 ч среду заменяли на OPTI-MEM®, содержащую 0,1% бычьего сывороточного альбумина. Исследуемые соединения получают в ДМСО, чтобы образовать 10 мМ маточные растворы. Проводят 3-кратные серийные разведения указанного маточного раствора в ДМСО, чтобы получить кривую разведения по десяти точкам с конечными значениями концентрации соединений, находящейся в пределах от 20 мкМ до 1 нМ с конечной концентрацией ДМСО в 0,5%. Добавляют указанные исследуемые соединения и после одного часа равновесного состояния добавляют TGFβ (конечная концентрация = 2 нМ, R&D Systems).

Через 24 ч добавляют буфер для лизиса [Glo Lysis Buffer (№ по каталогу E2661)] и люциферазный реагент [Promega Bright Glo Luciferase Reagent (№ по каталогу E2620)] в каждую лунку, чтобы удвоить объем лунки. Аликвоты (80 мкл) переносят в планшеты с белым твердым дном для снятия показаний люминесценции на планшете-ридере (Эмиссионный фильтр: Luminescence 700, 1 с снятия показаний). Подсчитывают процент ингибирования обработанных групп соединений по отношению к группе с минимальным ингибированием (исключительно ДМСО, необработанная). Вычисляют абсолютное значение IC₅₀ для каждого соединения по результатам исследования зависимости доза-ответ и концентрацию, необходимую для достижения 50% ингибирования. Данные, полученные по результатам исследований зависимости доза-ответ, подставляют в 4-параметрическое логистическое уравнение с применением программного обеспечения для анализа данных ActivityBase. Результаты данных анализов показывают, что приведенные в качестве примеров соединения являются эффективными ингибиторами активности репортерного гена люциферазы в клетках HEK293_SMAD2/3, стимулированных TGFβ. Например, все приведенные в качестве примеров соединения демонстрируют значения IC₅₀ меньше, чем 1 мкМ. В частно-

сти IC_{50} для примера 1 составляет 0,0824 мкМ ($\pm 0,005$, $n=2$).

Анализ IVTI.

Целью данного анализа является измерение способности исследуемого соединения ингибировать экспрессию pSMAD2 в опухолях у сингенной животной модели EMT6-LM2, другими словами, в указанном анализе измеряется способность исследуемого соединения ингибировать передачу сигнала TGF β R1 в солидной опухоли животной модели.

Образование клеток EMT6-LM2.

Клетки EMT-6 (ATCC, CRL-2755) подкожно имплантируют (5×10^5 /животное) в боковую область иммунокомпетентных мышей BALB/cAnNHsd (Harlan Laboratories). Когда размер опухолей достигает приблизительно 3000 мм³, животных умерщвляют посредством асфиксии CO₂. У животных с опухолью отделяют легкие и помещают в культуру. Легкие осторожно гомогенизируют для создания суспензии одиночных клеток. Клетки выращивают на культуральной среде (IMDM, 10% ФБС) и указанные опухолевые клетки выделяют с получением клеток EMT6-LM1. Описанную выше процедуру повторяют с применением клеток EMT6-LM1 для проведения имплантации, чтобы получить клетки EMT-LM2.

Очищенный фосфо-HIS-SMAD2 (pSMAD2).

Вставку нуклеотидной последовательности, кодирующей полноразмерный SMAD2 человека (NM_005901,5), осуществляют в вектор PFASTBACHTA™ (Invitrogen, № по каталогу 10584-027), что приводит к конструкции бакуловируса для экспрессии белка HIS-SMAD2. Вставку нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислоты от 148 до 503 TGF β R1 человека (NM_004612,2), с аминокислотой Thr, замененной на Asp в положении 204, осуществляют в вектор PFASTBACHTA™ (Invitrogen, № по каталогу 10584-027), что приводит к конструкции бакуловируса для экспрессии белка HIS-TGF β R1 (148-503)(T204D). Бакуловир формируют согласно протоколу Системы Экспрессии Бакуловируса BAC-TO-BAC®. Инфицируют клетки Sf9 в количестве $1,5 \times 10^6$ клеток/мл с применением 15 мл вируса P1 HIS-SMAD2 и вируса P1 HIS-TGF β R1 (148-503)(T204D) на литр культуры и инкубируют при 28°C в течение 45 ч. Добавляют оадаевую кислоту до значения конечной концентрации в 0,1 мкМ. После дополнительных трех часов инкубации указанные клетки собирают и хранят при -80°C для последующей очистки белка. Очистку белка проводят при 4°C. Замороженный осадок указанных клеток из 6 л культуры лизуют путем инкубации при перемешивании в 300 мл холодного буфера А (50 мМ фосфата натрия, pH 7,5, 300 мМ NaCl, 2 мМ β -меркаптоэтанол, 5 мМ имидазола, 10% глицерина, 0,1 мкМ оадаевой кислоты), содержащем 0,1% TRITON® X-100 и полностью свободную от EDTA смесь ингибиторов протеаз Roche, и гомогенизируют. Клеточные лизаты осветляют при помощи центрифугирования в роторе Beckman JA-18 в течение 45 мин при 16500 оборотах в минуту. Указанный супернатант инкубируют с 10 мл обладающей сродством к металлу смолы TALON (Clontech, № по каталогу 635504) в течение двух часов. Указанную порцию промывают 100 мл буфера А, содержащем 0,1% TRITON® X-100. Указанную смолу упаковывают на колонке и промывают буфером А. Указанный белок HIS-SMAD2 элюируют градиентом 0-100 мМ имидазола в буфере А. Накапливают указанные фракции, содержащие фосфо-HIS-SMAD2, и дополняют 0,1 мкМ оадаевой кислоты и 5 мМ EDTA. Концентрацию белка определяют при помощи анализа на содержание белка BioRad (Набор BioRad DC Protein Assay № 500-0116) с применением БСА в качестве стандарта. Указанный белок распределяют аликвотами и хранят при -80°C.

Живая фаза.

Клетки EMT6-LM2 культивируют в среде Дульбекко, модифицированной по способу Искова (IMDM), дополненной 10% ФБС, 2 мМ Glutamax и 0,1 мМ заменимых аминокислот, и инкубируют при 37°C в 5% CO₂. Трипсинизируют и выделяют указанные клетки из культуры. Указанные клетки повторно суспендируют в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS), далее смешивают с MATRIGEL® (1:1). Указанные клетки (5×10^5 /животное) подкожно имплантируют в заднюю боковую область мышей (самки мышей BALB/c, Harlan). Объем опухоли при помощи штангенциркуля и массу тела измеряют два раза в неделю. После того как объем опухоли достигает приблизительно 200-250 мм³, животных случайным образом распределяют и группируют по группам с носителем, представляющим контроль, и с соединением для лечения. Указанное соединение (приготовленное в 1% гидроксипропилцеллюлозы (ГЭЦ) и 0,25% TWEEN® 80 и 0,05% пеногасителя) и носитель в качестве контроля (1% ГЭЦ и 0,25% TWEEN® 80 и 0,05% пеногасителя) вводят через пероральный зонд. Ответ на дозу формируют путем исследования соединений в одной точке времени (2 ч) после однократной дозы в 2,7, 8,3, 25, 75 или 150 мг/кг. Проводят анализ временной динамики при рассчитанной дозе TED_{50} или TED_{80} (метод подробно изложен ниже) по результатам исследования зависимости доза-ответ, путем умерщвления мышей в различные моменты времени от 1 до 16 ч после однократной дозы.

Обработка ткани.

Опухолевые ткани собирают и гомогенизируют так, как описано ниже. Опухолевые ткани (~ 100 мг каждая) замораживают в жидком азоте и измельчают при помощи пестика. Измельченную ткань помещают в пробирку (пробирка Lysing Matrix A, MPBio № 6910-100) на сухом льду и гомогенизируют в буфере для лизиса (0,6 мл каждый) (150 мМ NaCl, 20 мМ Трис, pH 7,5; 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA); 1 мМ этиленгликольтетрауксусной кислоты (EGTA); 1% TRITON® X-100; Смесь ин-

гибиторов протеаз (Sigma P8340); Смесь ингибиторов фосфатаз II (Sigma P5726); Смесь ингибиторов фосфатаз III (Sigma P0044)) в течение 25 с, применяя гомогенизатор BIO101 FASTPREP® FP120 (настройка 4,5). Клеточный дебрис и гранулы осаждают при помощи центрифугирования при $14000 \times g$ в течение 10 мин при 4°C. Указанный лизат перемещают в новую микроцентрифужную пробирку и заново центрифугируют при $14000 \times g$ в течение 10 мин при 4°C. Центрифугированный лизат перемещают в 96-луночный планшет с глубокими лунками и держат на льду. Концентрацию указанного белка для каждого лизата определяют при помощи анализа на содержание белка BioRad (Набор BioRad DC Protein Assay № 500-0116) следующим образом. Рабочий реагент получают путем добавления реагента S и набора (20 мкл) к каждому 1 мл реагента A из набора, необходимого для указанного анализа. Готовят 3-5 разведенный стандарта белка от 0,2 до 1,5 мг/мл белка и получают калибровочную кривую. Пипеткой отбирают 5 мкл стандартов и образцов в чистый сухой микротитрационный планшет. В каждую лунку добавляют 25 мкл указанного рабочего реагента. В каждую лунку добавляют 200 мкл реагента B и перемешивают в течение 5 с. Через 15 мин снимают показания оптической плотности для каждой лунки при 750 нм. Уровни белка для каждой лунки определяют путем сравнения значений оптической плотности лунок с образцами со значениями калибровочной кривой, полученными из лунок со стандартами. При подготовке к анализу на содержание pSMAD2 и общего уровня SMAD2/3 при помощи ИФА в качестве метода, описанного ниже, лизаты опухолевых клеток нормализуют до 10 мг/мл буфером для лизиса.

ИФА SMAD.

Лизаты опухолевых клеток анализируют, применяя независимые планшеты для ИФА, где один планшет применяют для определения общего уровня SMAD 2/3, а другой планшет применяют для определения уровней фосфоSMAD2. В то время как покрывающее антитело одинаково для обоих планшетов, вторичное антитело является специфичным по отношению к общему SMAD 2/3 или фосфоSMAD2. Данные планшеты совместно относятся к "Планшетам для ИФА" и по отдельности к "Планшету для общего ИФА" и "Планшету для фосфо ИФА" соответственно. Покрывающее антитело получают в количестве 2,5 мкг/мл в BupH карбонатно-бикарбонатном буфере (моноклональное антитело по отношению к SMAD 2/3, BD Biosciences № 610843; BupH карбонат-бикарбонат от Pierce № 28382) и добавляют в количестве 100 мкл на лунку в 96-луночные иммуопланшеты (Thermo Scientific № 439454), и инкубируют в течение ночи при 4°C на качалке с платформой, чтобы получить планшеты для ИФА. Далее указанные планшеты для ИФА четыре раза промывают промывочным буфером (0,5% TWEEN® 20 в Трис-буферном солевом растворе (TBS), pH 8,0, получен от Sigma, № T-9039) и далее блокируют при помощи блокирующего буфера в количестве 200 мкл на лунку (1% бычьего сывороточного альбумина (BCA) в 1 $\times$ TBS) при комнатной температуре на шейкере с платформой в течение двух часов. Промывают четыре раза промывочным буфером. К планшету для ИФА фосфоSMAD добавляют в количестве 100 мкл на лунку лизата опухолевых клеток или лизата носителя в количестве 10 мг/мл в соответствующие лунки. К планшету для общего ИФА добавляют буфер для лизиса в количестве 98 мкл на лунку и 10 мг/мл лизата опухолевых клеток или лизата носителя в количестве 2 мкл на лунку в соответствующие лунки (0,02 мг конечного лизата белка). Калибровочную кривую также добавляют к каждому планшету для ИФА (как к фосфо, так и общему), применяя очищенный pSMAD2. Инкубируют в течение ночи. Указанные планшеты для ИФА заново промывают четыре раза промывочным буфером. Вторичные антитела (моноклональное антитело по отношению к фосфоSMAD2 кролика, Millipore, № 04-953; поликлональное антитело по отношению к SMAD 2/3 кролика, Millipore, № 07-408) подготавливают в разведении 1:500 в буфере для лизиса с добавлением 1% BCA и добавляют в количестве 100 мкл на лунку в соответствующий планшет. Указанные планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение двух-трех часов. Промывают четыре раза промывочным буфером и к планшетам добавляют репортерное антитело в количестве 100 мкл на лунку (антитело по отношению к HRP кролика, GE Healthcare № NAV934V, разведенное 1:10000 в блокирующем буфере). Инкубируют в течение одного часа при комнатной температуре и указанные планшеты промывают последние четыре раза промывочным буфером, и добавляют 3,3',5,5'-тетраметилбензидин в количестве 100 мкл на лунку при комнатной температуре (ТМБ; Surmodics/BioFX № TMBW-0100-01). Планшеты инкубируют при 37°C в течение тридцати мин. Реакцию останавливают добавлением 100 мкл стоп-раствора (1N H₂SO₄). Снимают показания значений оптической плотности (ОП) при 450 нм на планшете-ридере.

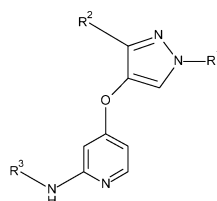
Соотношение общего SMAD (tSMAD) к фосфоSMAD (pSMAD) применяют для группы с носителем для определения минимального ингибирования (0%) сигнала pSMAD. Рассчитывают процент ингибирования для групп, получавших лечение соединениями, по отношению к минимальному ингибированию pSMAD для группы с носителем. Вычисляют TED₅₀ и TED₈₀ по результатам исследования зависимости доза-ответ (доза, необходимая для достижения 50 и 80% ингибирования в данный момент времени соответственно), применяя процедуру NLIN в SAS (версия 9,3, Cary, NC). Данный анализ показывает, что пример 1 обладает значением TED₅₀ в 10,8 мг/кг через 2 ч после 1-й дозы и TED₈₀ в 24,1 мг/кг. В ходе проведения анализа временной динамики при дозе TED₅₀ (11 pmk) пример 1 демонстрирует 48% ингибирование через один час и 39% ингибирование через два часа после дозирования. В ходе проведения анализа временной динамики при TED₈₀ (25 pmk) пример 1 демонстрирует 71% ингибирование через один

час и 70% ингибирование через два часа после дозирования.

Указанные соединения согласно настоящему изобретению являются в целом эффективными в широком диапазоне дозировок. Например, значения дозировок на день обычно находятся в дневном диапазоне приблизительно от 1 до 2000 мг. Предпочтительно такие дозы находятся в пределах дневного диапазона от 10 до 1000 мг. Более предпочтительно такие дозы находятся в дневном диапазоне от 10 до 100 мг. Еще более предпочтительно такие дозы находятся в дневном диапазоне от 10 до 80 мг. Наиболее предпочтительно такие дозы находятся в дневном диапазоне от 10 до 50 мг. В некоторых случаях уровни дозирования, находящиеся ниже нижнего предела вышеуказанных диапазонов, могут быть более чем достаточными, в то время как в других случаях могут быть использованы еще более высокие дозы, и, следовательно, вышеуказанные диапазоны дозировок не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения каким-либо образом. Следует понимать, что фактически вводимое количество указанного соединения будет определяться лечащим врачом в свете соответствующих обстоятельств, включая состояния, подлежащие лечению, выбранный способ введения, фактически вводимое соединение или соединения, возраст, массу и реакцию конкретного пациента и тяжесть симптомов пациента.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы



где R¹ представляет собой водород, изопропил, диформетил, дифторэтил или циклопропил;

R² представляет собой этил, трет-бутил, пиридин-2-ил, тетрагидропиран-4-ил, тетрагидрофуран-3-ил, циклопропил или циклобутил; и

R³ представляет собой карбамоилфенил, пиридин-2-ил, (1-гидрокси-1-метилэтил)пиридинил, 1-метил-2-оксо-1Н-пиридин-4-ил, 1-метилпиразолил, пиразин-2-ил, 2-метоксипиримидин-4-ил, 1-метил-2-оксо-1Н-пиримидин-4-ил, пиридазин-3-ил, 6-хлорпиридазин-3-ил, 6-метилпиридазин-3-ил или 6-метоксипиридазин-3-ил;

или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение представляет собой 2-{4-[(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол.

3. Соединение по п.1 или 2 или его фармацевтически приемлемая соль, где соль представляет собой 2-{4-[(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол 4-метилбензолсульфонат.

4. Соединение по любому из пп.1-3 или его фармацевтически приемлемая соль, где соль представляет собой кристаллический 2-{4-[(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол 4-метилбензолсульфонат.

5. Соединение по любому из пп.1-4 или его фармацевтически приемлемая соль, где соль представляет собой кристаллический 2-{4-[(4-{[1-циклопропил-3-(тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)-1Н-пиразол-4-ил]окси}пиридин-2-ил)амино]пиридин-2-ил}пропан-2-ол 4-метилбензолсульфонат, характеризующийся дифрактограммой рентгеновской порошковой дифракции (излучение меди, λ -1,54060 Å), содержащей пик при 17,8° с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из 19,7, 18,4 и 22,0° (2 θ ± 0,2°).

6. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1-5 или его фармацевтически приемлемую соль и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, носителей или разбавителей.

7. Применение соединения по любому из пп.1-5 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения рака.

8. Применение по п.7, отличающееся тем, что рак выбран из группы, состоящей из рака толстой кишки, меланомы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака почки, глиобластомы, рака поджелудочной железы, миелодиспластического синдрома, рака легких и рака желудка.

9. Применение соединения по любому из пп.1-5 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения фиброза.

10. Применение по п.9, отличающееся тем, что фиброз выбран из группы, состоящей из фиброза печени и хронического заболевания почек.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2