

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **027782**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2017.08.31

(21) Номер заявки
201591907

(22) Дата подачи заявки
2014.04.01

(51) Int. Cl. **C07D 239/47** (2006.01)
C07C 311/08 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(54) **ИНГИБИТОР КИНАЗ**

(31) **1305945.6; 1322678.2; 1402647.0**

(32) **2013.04.02; 2013.12.20; 2014.02.14**

(33) **GB**

(43) **2016.02.29**

(86) **PCT/GB2014/051018**

(87) **WO 2014/162122 2014.10.09**

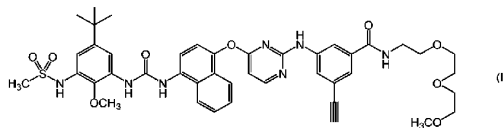
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РЕСПАЙВЕРТ ЛИМИТЕД;
ТОПАЙВЕРТ ФАРМА ЛИМИТЕД
(GB)**

(72) Изобретатель:
Файф Мэттью Колин Тор (GB)

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

(56) **WO-A1-2004014870
WO-A2-2011158042**

(57) Предложено соединение формулы (I)



которое обладает противовоспалительной активностью (например, через ингибирование одного или нескольких членов из числа: семейства ферментов р38 митоген-активируемой протеинкиназы; Syk-киназы и Src семейства тирозинкиназ) и находит применение при лечении, в том числе в фармацевтических комбинациях, особенно при лечении воспалительных заболеваний, включая воспалительные заболевания легких, глаз и желудочно-кишечного тракта.

B1**027782****027782****B1**

Данное изобретение в числе прочего относится к соединению, которое является противовоспалительным средством (например, через ингибирование одного или нескольких членов из семейства ферментов p38 митоген-активируемой протеинкиназы (именуемых здесь как ингибиторы p38 MAP киназы), например, их подтипа альфа-киназы; Syk киназы; и Src-семейства тирозинкиназ). Изобретение также относится к применению такого соединения в терапии, в том числе в моно- и комбинированной терапии, особенно при лечении воспалительных заболеваний, включая воспалительные заболевания легких (такие как астма и хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ (COPD)), глаз (такие как увеит или сухой кератоконъюнктивит (сухость глаз)) и желудочно-кишечного тракта (такие как болезнь Крона и неспецифический язвенный колит).

Перечисление или обсуждение несомненно ранее опубликованных документов в этом описании не следует обязательно рассматривать, как подтверждение, что документ является частью современного состояния в данной области техники или представляет собой обычные общедоступные знания.

Идентифицировано четыре изоформы p38 MAPK (альфа, бета, гамма и дельта, соответственно), каждая из которых проявляет разные модели экспрессии в тканях. Альфа- и бета-изоформы p38 MAPK обнаружены повсеместно во всем организме, присутствуют во многих типах разных клеток и ингибируются рядом ранее описанных низкомолекулярных соединений. Ранние классы ингибиторов были высокотоксичными вследствие широкого распространения в тканях этих изоформ, что приводило к побочным эффектам соединений. Некоторые из недавно идентифицированных ингибиторов проявляют улучшенную селективность для альфа- и бета-изоформ p38 MAPK и имеют более широкие пределы безопасности.

Как полагают, p38 MAP-киназа играет ключевую роль во многих путях передачи сигнала, которые вовлечены в инициирование и поддержание хронического, трудноизлечимого воспаления при заболевании человека, например, при тяжелой астме, ХОЗЛ или воспалительном заболевании кишечника (ВЗК (IBD)). В настоящее время существует обширная литература, в которой демонстрируется, что p38 MAP-киназу активирует целый ряд провоспалительных цитокинов и что ее активация приводит к рекрутингу и высвобождению дополнительных провоспалительных цитокинов. Действительно, данные некоторых клинических исследований показывают благоприятные изменения в заболевании у пациентов во время лечения с помощью ингибиторов p38 MAP-киназы. Например, Смит описывает ингибирующий эффект ингибиторов p38 MAP-киназы на высвобождение TNF α (но не IL-8) из мононуклеарных клеток периферической крови (МПКК (PBMC)) человека (Smith, S. J., Br. J. Pharmacol., 2006, 149:393-404).

Также предложено использование ингибиторов p38 MAP-киназы при лечении ХОЗЛ и ВЗК. Низкомолекулярные ингибиторы, нацеленные на p38 MAPK α/β , как подтверждено, эффективны при снижении различных показателей воспаления в:

клетках и тканях, полученных от больных ХОЗЛ, которые обычно являются кортикостероид-нечувствительными (Smith, S. J., Br. J. Pharmacol., 2006, 149:393-404);

биопсии от больных ВЗК (Docena, G. et al., J. Trans. Immunol., 2010, 162:108-115); и

in vivo животных моделях (Underwood, D. C. et al., Am. J. Physiol., 2000, 279:L895-902; Nath, P. et al., Eur. J. Pharmacol., 2006, 544:160-167).

Игусен и соавторы также подтверждают вероятность вовлечения p38 MAPK α/β в кортикостероидную нечувствительность через уменьшение связывающего сродства глюкокортикоидного рецептора (GR) в ядре клетки (Irgsen, E. et al., J. Allergy Clin. Immunol., 2002, 109:649-657). Клинические исследования при воспалительных заболеваниях с целым рядом ингибиторов p38 MAP-киназы, включая AMG548, BIRB 796, VX702, SCIO469 и SCIO323, описаны в публикации Lee, M. R., Dominguez, C, Current Med. Chem., 2005, 12:2979-2994. Однако основной помехой, препятствующей применению ингибиторов p38 MAP-киназы при лечении хронических воспалительных заболеваний человека, является токсичность, отмеченная у пациентов. Токсичность была достаточно тяжелой, чтобы привести к отклонению от клинических испытаний многих предложенных соединений, в том числе всех соединений, конкретно упомянутых выше.

ХОЗЛ представляет собой состояние, при котором лежащее в основе воспаление, как сообщают, является по существу устойчивым к противовоспалительным эффектам ингаляционных кортикостероидов. Следовательно, необходима лучшая стратегия лечения ХОЗЛ, чтобы выработать вмешательство, которое проявляет как собственные противовоспалительные эффекты, так способность повышать чувствительность тканей легкого у больных ХОЗЛ к ингаляционным кортикостероидам. Недавняя публикация Mercado et al. (2007; American Thoracic Society Abstract A56) показывает, что выключение p38 MAPK обладает потенциалом для восстановления чувствительности к кортикостероидам. Таким образом, может иметь место двойная польза для пациентов при использовании ингибитора p38 MAP-киназы в ходе лечения ХОЗЛ.

Большое число больных с диагностированной астмой или ХОЗЛ продолжают страдать от неконтролируемых симптомов и от обострений их болезненного состояния, что может привести к госпитализации. Это происходит несмотря на применение наиболее перспективных, доступных в настоящее время схем лечения, включающих комбинированные лекарства из ингаляционных кортикостероидов и длительно действующих β -агонистов. Данные, накопленные за последнее десятилетие, показывают, что не-

удача в сдерживании развития лежащего в основе воспалительного компонента заболевания в легких наиболее вероятно является причиной того, что происходит обострение. С учетом установленной эффективности кортикостероидов в качестве противовоспалительных средств и, в частности, ингаляционных кортикостероидов, при лечении астмы, эти открытия спровоцировали интенсивные исследования. Проведенные исследования показали, что некоторые факторы окружающей среды инициируют кортикостероид-нечувствительность воспалительных изменений в легких больных. Примером является реакция, возникающая из-за опосредуемых вирусом инфекций верхних дыхательных путей (ОРВИ (URTI)), которые имеют особое значение в увеличении смертности, связанной с астмой и ХОЗЛ.

Ранее было раскрыто, что соединения, которые ингибируют активность как c-Src, так и Syk каназ, являются эффективными средствами против репликации риновируса (Chagton, C.E. et al., WO 2011/158042), и что соединения, которые ингибируют p59-HCK, являются эффективными против репликации вируса гриппа (Chagton, C.E. et al., WO 2011/070369). Вместе с ингибированием p38 MAPK такие свойства являются особенно привлекательными свойствами для соединений, которые предназначены для лечения больных с хроническими респираторными заболеваниями.

Некоторые ингибиторы p38 MAPK описаны как ингибиторы репликации респираторного синцитиального вируса (Cass L. et al., WO 2011/158039).

Точная этиология ВЗК не ясна, но, как полагают, она управляется генетическими факторами и факторами окружающей среды, которые взаимодействуют, стимулируя избыточную или плохо контролируемую воспалительную реакцию слизистых, направленную против компонентов внутриполостной микрофлоры. Эта реакция опосредуется инфильтрацией воспалительных нейтрофилов, дендритными клетками и Т-клетками с периферии. p38 становится очевидной мишенью для исследования в моделях ВЗК вследствие с ее повсеместной экспрессии в воспалительных клетках. Исследования эффективности ингибиторов p38 в животных моделях ВЗК и биопсиях человека от больных, показали, что p38 могли бы быть мишенью в случае лечения ВЗК (Hove, T. ten et al., Gut, 2002, 50:507-512, Docena, G. et al., J. Trans. Immunol., 2010, 162:108-115). Однако такие открытия не полностью соответствуют другим группам, сообщаящим об отсутствии эффекта с помощью ингибиторов p38 (Malamut G. et al., Dig. Dis. Sci, 2006, 51:1443-1453). Клинические исследования на пациентах с болезнью Крона с использованием ингибитора p38-альфа BIRB796 показали потенциальную клиническую пользу с улучшением уровней С-реактивного белка. Однако улучшение было временным, возвращаясь к начальному уровню к 8 неделе. (Schreiber, S. et al., Clin. Gastro. Hepatology, 2006, 4:325-334). Немногочисленные клинические исследования эффективности CNI-1493, ингибитора p38 и Jnk, у пациентов с серьезной болезнью Крона показывали значительное улучшение клинического показателя на протяжении 8 недель (Hommes, D. et al. Gastroenterology. 2002 122:7-14).

Как известно, Т-клетки играют ключевую роль при опосредовании воспаления желудочно-кишечного тракта. Уникальная работа Powrie с коллегами показала, что перенос нативных CD4+ клеток в животных с тяжелой комбинированной иммунонедостаточностью (ТКИН (SCID)) приводит к развитию колита, который зависит от присутствия условно-патогенных бактерий (Powrie F. et al. Int Immunol. 1993 5:1461-71). Кроме того, изучение мукозных мембран от больных ВЗК показало повышающую регуляцию CD4+ клеток, которая является или Th1 (IFN γ /IL-2) или Th2 (IL5/TGF β) смещенной в зависимости от того, болен ли пациент болезнью Крона или неспецифическим язвенным колитом (Fuss IJ. et al. J Immunol. 1996 157:1261-70.). Аналогично, Т-клетки, как известно, играют ключевую роль в воспалительных нарушениях глаз, причем ряд исследований сообщает о повышенных уровнях ассоциированных с Т-клетками цитокинов (IL-17 и IL-23) в сыворотке больных с синдромом Бехчета (Chi W. et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008 49:3058-64). В поддержку этих наблюдений Direskeneli с коллегами показал, что больные с синдромом Бехчета имеют повышенные уровни клеток Th17 и пониженные уровни клеток Treg в их периферической крови (Direskeneli H. et al. J Allergy Clin Immunol. 2011 128:665-6).

Один из приемов ингибирования активации Т-клеток включает киназы-мишени, которые вовлечены в активацию сигнального комплекса Т-клеточного рецептора. Киназы семейства Syk и Src, как известно, играют ключевую роль в этом метаболическом пути, где киназы семейства Src, Fyn и Lck, представляют собой первые сигнальные молекулы, которые должны быть активированы ниже Т-клеточного рецептора (Barber EK. et al. PNAS 1989, 86:3277-81). Они инициируют фосфорилирование тирозина Т-клеточного рецептора, приводя к рекрутингу киназы семейства Syk, ZAP-70.

Исследования на животных показали, что выключение ZAP-70 приводит к клиническому проявлению ТКИН (Chan AC. et al. Science. 1994, 10;264 (5165) :1599-601).

Клинические испытания на больных ревматоидным артритом с применением ингибитора Syk, фосфатаматиниба (Fostamatinib), показали возможности Syk в качестве противовоспалительной мишени, причем больные проявили улучшенные клинические результаты и пониженные уровни в сыворотке IL-6 и MMP-3 (Weinblatt ME. et al. Arthritis Rheum. 2008 58:3309-18). Syk киназа широко экспрессируется с клетках кровотоковой системы, наиболее заметно в В-клетках и зрелых Т-клетках. Через взаимодействие с иммунорецепторными тирозиновыми активирующими мотивами (ИТАМ (ITAM)) она играет важную роль при регуляции Т-клеток и росте В-клеток, также опосредуя передачу сигнала иммунорецептора в воспалительных клетках. Активация Syk приводит к высвобождению IL-6 и MMP - медиаторов воспали-

ния, обычно считаемых повышающими регуляцию при воспалительных заболеваниях, включая ВЗК и ревматоидный артрит (Wang YD. et al World J Gastroenterol 2007; 13: 5926-5932, Litinsky I et al. Cytokine. 2006 Jan 33:106-10).

Помимо ключевой роли в системах клеточных сигналов, которые контролируют провоспалительные пути метаболизма, киназные ферменты, как также установлено в настоящее время, регулируют активность целого ряда клеточных функций, включая поддержание целостности ДНК (Shilo, Y. Nature Reviews Cancer, 2003, 3: 155-168) и координацию сложных процессов деления клеток. Действительно, некоторые ингибиторы киназ (так называемых "киназ Olaharski"), как было найдено, меняют частоту образования микроядер in vitro (Olaharski, A. J. et al., PLoS Comput. Biol., 2009, 5(7), e1000446; doi: 10.1371/journal.pcbi.1000446). Образование микроядер вовлечено в, или связано с, нарушением митотических процессов и, следовательно, нежелательно. Ингибирование глюкоген-синтаза-киназы 3α (GSK3 α), как установлено, является особенно значимым фактором, который повышает вероятность появления ингибитора киназы, стимулирующего образование микроядер. Кроме того, ингибирование киназы GSK3 β с помощью RNAi, как сообщается, стимулирует образование микроядер (Tighe, A. et al., BMC Cell Biology, 2007, 8:34).

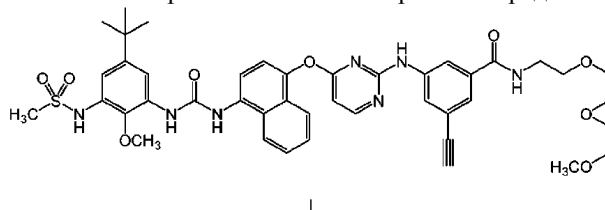
Хотя возможно смягчение отрицательных эффектов ингибирования киназ Olaharski, таких как GSK3 α , за счет оптимизации дозы и/или за счет изменения пути введения молекулы, было бы целесообразно идентифицировать другие терапевтически полезные молекулы с низким или незначительным ингибированием киназ Olaharski, таких как GSK 3 α , и/или иметь низкое или незначительное нарушение митотических процессов (например, которые измеряют при оценке митоза).

Различные соединения, в том числе производные мочевины, раскрыты как ингибирующие одну или несколько киназ. Примеры таких соединений можно найти в публикациях WO 99/23091, WO 00/041698, WO 00/043384, WO 00/055139, WO 01/36403, WO 01/4115, WO 02/083628, WO 02/083642, WO 02/092576, WO 02/096876, WO 2003/005999, WO 2003/068223, WO 2003/068228, WO 2003/072569, WO 2004/014870, WO 2004/113352, WO 2005/005396, WO 2005/018624, WO 2005/023761, WO 2005/044825, WO 2006/015775, WO 2006/043090, WO 2007/004749 и WO 2007/053394. Другие примеры можно найти в статьях, опубликованных в Curr. Opin. Drug Devel. (2004, 7(5), 600-616); J. Med. Chem. (2007, 50, 4016-4026; 2009, 52, 3881-3891; and 2010, 53, 5639-5655); Bioorg. Med. Chem. Lett. (2007, 11, 354-357; 2008, 18, 3251-3255; 2009, 19, 2386-2391; и 2010, 20, 4819-4824); Curr. Top. Med. Chem. (2008, 8, 1452-1467); Bioorg. Med. Chem. (2010, 18, 5738-5748); Eur. J. Pharmacol. (2010, 632, 93-102) и J. Chem. Inf. Model. (2011, 51, 115-129).

Тем не менее остается потребность в идентификации и разработке новых ингибиторов киназ, точнее альтернативных ингибиторов p38 MAP-киназы, которые приемлемы для лечения воспаления. Особенно существует потребность в таких ингибиторах, которые обладают улучшенным терапевтическим потенциалом в сравнении с современными доступными способами лечения, или, в частности, которые проявляют превосходный терапевтический индекс (например, ингибиторы, которые, по меньшей мере, являются такими же эффективными и с одной или нескольких точек зрения являются менее токсичными при соответствующей терапевтической дозе, чем предыдущие средства).

В настоящее время неожиданно установлено, что анилин-замещенная диарилмочевина ингибирует одну или несколько киназ из числа p38 MAP-киназы, семейств киназ Syk и Src, и, следовательно, обладает хорошими противовоспалительными свойствами.

Таким образом, в соответствии с первым аспектом изобретения предложено соединение формулы I



или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или изотопное производное, и это соединение в дальнейшем может называться "соединением изобретения".

Фармацевтически приемлемые соли, которые могут быть упомянуты, включают кислотно-аддитивные соли и основно-аддитивные соли. Такие соли могут быть получены обычными способами, например, реакцией соединения формулы I в форме свободной кислоты или свободного основания с одним или несколькими эквивалентами подходящей кислоты или подходящего основания, необязательно в растворителе или в среде, в которых соль нерастворима, после чего следует удаление указанного растворителя или указанной среды с использованием стандартных методик (например, в вакууме, сушкой вымораживанием или фильтрованием). Соли также могут быть получены обменом противоиона соединения формулы I в форме соли с другим противоионом, например, с использованием подходящей ионообменной смолы.

Примеры фармацевтически приемлемых солей включают кислотно-аддитивные соли, полученные

из минеральных кислот и органических кислот, а также соли, полученные из металлов.

Для исключения неоднозначности толкования следует уточнить, что соединение формулы I может содержать указанные атомы в любых их природных или не природных изотопных формах. В этой связи варианты осуществления настоящего изобретения, которые могут быть упомянуты, включают варианты, в которых:

(а) соединение формулы I не является изотопно-обогащенным или меченым относительно каких-либо атомов соединения; и

(b) соединение формулы I является изотопно-обогащенным или меченым относительно одного или нескольких атомов соединения.

В данном случае ссылки на "изотопное производное" относятся ко второму из этих двух вариантов осуществления. В конкретных вариантах осуществления изобретения соединение формулы I является изотопно-обогащенным или меченым (относительно одного или нескольких атомов соединения) одним или несколькими стабильными изотопами. Следовательно, соединения изобретения, которые могут быть упомянуты, включают, например, соединения формулы I, которые являются изотопно-обогащенными или мечеными одним или несколькими атомами, такими как дейтерий или другие.

Соединения формулы I могут проявлять таутомеризм. Все таутомерные формы и их смеси включены в объем изобретения.

Соединение формулы I имеет название 3-((4-((3-(5-(трет-бутил)-2-метокси-3-(метилсульфонамидо)фенил)уреидо)нафталин-1-ил)окси)пиримидин-2-ил)амино)-5-этинил-N-(2-(2-(2-метоксиэтоксидокси)этил)бензамид. Однако оно также может быть названо 3-[[4-[[4-[[5-трет-бутил-3-(метансульфонамидо)-2-метоксифенил]карбамоиламино]-1-нафтил]окси]пиримидин-2-ил]амино]-5-этинил-N-[2-[2-(2-метоксиэтоксидокси)этил]бензамидом.

Таким образом, в одном варианте изобретения относится к 3-((4-((3-(5-(трет-бутил)-2-метокси-3-(метилсульфонамидо)фенил)уреидо)нафталин-1-ил)окси)пиримидин-2-ил)амино)-5-этинил-N-(2-(2-(2-метоксиэтоксидокси)этил)бензамиду).

Примеры солей соединения формулы I включают все фармацевтически приемлемые соли, такие как, но без ограничения, кислотно-аддитивные соли сильных минеральных кислот, например, соли HCl и HBr, и кислотно-аддитивные соли сильных органических кислот, таких как метансульфоновая кислота.

В данном описании ссылки на соединение изобретения (соединение формулы I), как подразумевают, включают ссылки на соединение и на все фармацевтически приемлемые соли, сольваты и/или таутомеры указанных соединений, если в контексте конкретно не указано другое. В этой связи сольваты, которые могут быть упомянуты, включают гидраты.

Соединение изобретения (соединение формулы I) является ингибитором p38 MAP-киназы (особенно подтипа альфа) и, следовательно, полезны в медицине, в частности для лечения воспалительных заболеваний. Таким образом другие аспекты изобретения, которые могут быть упомянуты, включают приведенные ниже аспекты.

(а) Фармацевтический препарат, содержащий соединение формулы I, которое определено выше, или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или изотопное производное, в смеси с фармацевтически приемлемым адьювантом, разбавителем или носителем.

(b) Комбинированное лекарственное средство, содержащее:

(A) соединение формулы I, которое определено выше, или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или изотопное производное,

(B) другое терапевтическое средство,

где каждый из компонентов (A) и (B) составлен в смеси с фармацевтически приемлемым адьювантом, разбавителем или носителем.

В этом аспекте изобретения комбинированное лекарственное средство может представлять собой или один (комбинированный) фармацевтический препарат или набор из частей.

Таким образом, этот аспект изобретения охватывает фармацевтический препарат, включающий соединение формулы I, которое определено выше, или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или изотопное производное, и другое терапевтическое средство в смеси с фармацевтически приемлемым адьювантом, разбавителем или носителем (и этот препарат далее называют "комбинированным препаратом").

Изобретение также охватывает набор из частей, содержащий компоненты:

(i) фармацевтический препарат, включающий соединение формулы I, которое определено выше, или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или изотопное производное в смеси с фармацевтически приемлемым адьювантом, разбавителем или носителем; и

(ii) фармацевтический препарат, включающий другое терапевтическое средство, в смеси с фармацевтически приемлемым адьювантом, разбавителем или носителем,

и эти компоненты (i) и (ii) каждый представлен в форме, которая приемлема для введения в сочетании с другим.

Компонент (i) набора из частей, таким образом, представляет собой компонент (A), описанный выше, в смеси с фармацевтически приемлемым адьювантом, разбавителем или носителем. Аналогично,

компонент (ii) представляет собой компонент (B), описанный выше, в смеси с фармацевтически приемлемым адъювантом, разбавителем или носителем.

(c) Способ получения фармацевтического препарата аспекта (a), описанного выше, причем указанный способ включает стадию смешения соединения формулы I, которое определено выше, или его фармацевтически приемлемых соли, сольвата или изотопного производного, с фармацевтически приемлемым адъювантом, разбавителем или носителем.

Варианты осуществления этого аспекта изобретения, которые могут быть упомянуты, включают варианты, в которых фармацевтически приемлемый адъювант, разбавитель или носитель, представляет собой адъювант, разбавитель или носитель, приемлемый для локального применения, (и/или где способ предназначен для получения локального фармацевтического препарата, то есть, фармацевтического препарата, который адаптирован для локального применения).

(d) Соединение формулы I, которое определено выше, или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или изотопное производное для применения в медицине (или для применения в качестве лекарственного средства или в качестве фармацевтического средства).

(e) Соединение формулы I, которое определено выше, или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или изотопное производное, или фармацевтический препарат или комбинированное лекарственное средство, которые определены выше в связи с аспектом (a) или (b) изобретения, для применения при лечении или для профилактики воспалительного заболевания.

(f) Применение соединения формулы I, которое определено выше, или его фармацевтически приемлемых соли, сольвата или изотопного производного, или фармацевтического препарата или комбинированного лекарственного средства, которые определены в связи с аспектом (a) или (b) изобретения, для получения лекарственного средства для лечения или профилактики воспалительного заболевания.

(g) Способ лечения или профилактики воспалительного заболевания, включающий введение субъекту эффективного количества соединения формулы I, которое определено выше, или его фармацевтически приемлемых соли, сольвата или изотопного производного, или фармацевтического препарата или комбинированного лекарственного средства, которые определены в связи с аспектом (a) или (b) изобретения.

(h) Способ сенсibilизации субъекта к противовоспалительным эффектам кортикостероида, включающий введение субъекту эффективного количества соединения формулы I, которое определено выше, или его фармацевтически приемлемых соли, сольвата или изотопного производного, или фармацевтического препарата или комбинированного лекарственного средства, которые определены в связи с аспектом (a) или (b) изобретения.

Варианты осуществления этого аспекта изобретения, которые могут быть упомянуты, включают варианты, где субъектом является субъект, который стал невосприимчивым к противовоспалительным эффектам кортикостероида.

Препараты

Что касается описанных выше аспектов (a) и (b), то разбавители и носители, которые могут быть упомянуты, включают разбавители и носители, приемлемые для парентерального, перорального, локального, мукозального и ректального введения.

Фармацевтические препараты и комбинированные лекарственные средства описанных выше аспектов (a) и (b) могут быть получены, например, для парентерального, подкожного, внутримышечного, внутривенного, интраартикулярного, интравитриального, периокулярного, ретробульбарного, субконъюнктивального, субтенонового, местного офтальмологического или перисуставного введения, в частности, в форме жидких растворов, эмульсий или суспензий; для перорального введения, в частности, в форме таблеток или капсул, и особенно с использованием методик, направленных на достижение высвобождения лекарства в толстой кишке (Patel, M. M. Expert Opin. Drug Deliv. 2011, 8 (10), 1247-1258); для локального, например, ингаляционного или интраназального введения, в частности, в форме порошков, назальных капель или аэрозолей, и трансдермального введения; для местного офтальмологического введения, в частности, в форме растворов, эмульсий, суспензий, мазей, имплантатов/вставок, гелей, желе или препаратов липосомальных микрочастиц (Ghate, D.; Edelhauser, H. F. Expert Opin. Drug Deliv. 2006, 3 (2), 275-287); для офтальмологического введения, в частности, в форме биоразрушаемых и небiorазрушаемых имплантатов, липосом и наночастиц (Thrimawithana, T.R. et al. Drug Discov. Today 2011, 16 (5/6), 270-277); для мукозального введения, например, на слизистые оболочки щеки, под язык или вагинально, и для ректального введения, например, в форме свечей или клизмы.

Фармацевтические препараты и комбинированные лекарственные средства описанных выше аспектов (a) и (b) обычно могут быть введены в стандартной дозированной лекарственной форме и могут быть приготовлены способами, хорошо известными в фармацевтической области, например, описанными в публикации Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA., (1985). Препараты для парентерального введения могут содержать в качестве наполнителей стерильную воду или физиологический раствор, алкиленгликоли, такие как пропиленгликоль, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения, гидрированные нафталины и т.д. Препараты для назального введения могут быть твердыми и могут содержать наполнители, например, лактозу

или декстрин, или они могут представлять собой водные или масляные растворы для применения в форме назальных капель или дозированных спреев. В случае буккального введения местные наполнители включают сахара, стеарат кальция, стеарат магния, прежелатинизированный крахмал и другие.

Фармацевтические препараты и комбинированные лекарственные средства, приемлемые для перорального введения, могут содержать один или несколько физиологически совместимых носителей и/или наполнителей и могут находиться в твердой или жидкой форме. Таблетки и капсулы могут быть получены со связующими агентами, например, с сиропом, аравийской камедью, желатином, сорбитом, трагакантом или поливинилпирролидоном; наполнителями, такими как лактоза, сахароза, кукурузный крахмал, фосфат кальция, сорбит или глицерин; смазывающими веществами, такими как стеарат магния, тальк, полиэтиленгликоль или диоксид кремния; и поверхностно-активными веществами, такими как лаурилсульфат натрия. Жидкие композиции могут содержать обычные добавки, такие как суспендирующие агенты, например, сироп сорбита, метилцеллюлозу, сахарный сироп, желатин, карбоксиметилцеллюлозу или пищевые жиры; эмульгирующие агенты, такие как лецитин или аравийская камедь; растительные масла, такие как миндальное масло, кокосовое масло, рыбий жир или арахисовое масло; консерванты, такие как бутилированный гидроксианизол (БНА) и бутилированный гидрокситолуол (БНТ). Жидкие композиции могут быть инкапсулированы, например, в желатине, с получением стандартной дозированной лекарственной формы.

Твердые пероральные дозированные лекарственные формы включают таблетки, капсулы из состоящей из двух частей твердой оболочки и мягкие эластичные желатиновые капсулы (SEG). Такие капсулы из состоящей из двух частей твердой оболочки могут быть изготовлены, например, из желатина или гидроксипропилметил-целлюлозы (ГПМЦ (HPMC)).

Рецептура сухой оболочки, как правило, содержит приблизительно от 40 до 60% масс./масс. желатина, приблизительно от 20 до 30% пластификатора (такого как глицерин, сорбит или пропиленгликоль) и приблизительно от 30 до 40% воды. Другие материалы, такие как консерванты, красители, замутнители и вкусо-ароматизирующие вещества, также могут присутствовать. Жидкий наполняющий материал содержит твердое лекарство, которое растворено, солюбилизировано или диспергировано (с помощью суспендирующих агентов, таких как пчелиный воск, гидрированное касторовое масло или полиэтиленгликоль 4000), или жидкое лекарство в носителях или в комбинации носителей, таких как минеральное масло, растительные масла, триглицериды, гликоли, полиолы и поверхностно-активные агенты.

Соединение настоящего изобретения может быть введено локально (например, на легкие, глаза или стенки кишечника). Таким образом, варианты осуществления описанных выше аспектов (а) и (b), которые могут быть упомянуты, включают фармацевтические препараты и комбинированные лекарственные средства, которые приспособлены для локального введения. Такие препараты включают препараты, в которых наполнители (в том числе любой адъювант, разбавитель и/или носитель) являются локально приемлемыми.

Локальное введение в легкие может быть осуществлено путем использования аэрозольного препарата. Аэрозольные препараты, как правило, содержат активный ингредиент, суспендированный или растворенный в подходящем аэрозольном пропелленте, таком как хлорфторуглерод (ХФУ (CFC)) или гидрофторуглерод (ГФУ (HFC)). Подходящие ХФУ пропелленты включают трихлормонофторметан (пропеллент 11), дихлортетрафторэтан (пропеллент 114) и дихлордифторметан (пропеллент 12). Подходящие ГФУ пропелленты включают тетрафторэтан (HFC-134a) и гептафторпропан (HFC-227). Пропеллент, как правило, составляет от 40 до 99,5%, например, от 40 до 90% масс. всей ингаляционной композиции. Препарат может содержать наполнители, в том числе со-растворители (например, этанол) и поверхностно-активные вещества (например, лецитин, сорбитан триолеат и подобные вещества). Другие возможные наполнители включают полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, глицерин и др. Аэрозольные препараты упаковывают в емкости и подходящие дозы доставляют посредством дозирующего клапана (например, поставляемого Bepak, Valois или 3M, или, с другой стороны, Aptar, Coster или Vari).

Локальное введение в легкие также может быть достигнуто за счет использования не находящегося под давлением препарата, такого как водный раствор или суспензия. Он может быть введен посредством распылителя, например, распылителя, который может быть ручным и портативным или предназначенным для использования дома или в больнице (то есть, не портативным). Препарат может содержать наполнители, такие как вода, буферные растворы, регулирующие тоничность агенты, pH-регулирующие агенты, поверхностно-активные вещества и со-растворители. Суспензионные жидкие и аэрозольные препараты (или под давлением или не находящиеся под давлением), как правило, будут содержать соединение изобретения в тонкоизмельченной форме, например, с D_{50} 0,5-10 мкм, например, около 1-5 мкм. Распределение частиц по размерам может быть представлено с использованием значений D_{10} , D_{50} и D_{90} . Медианное значение D_{50} распределений частиц по размерам определяют, как размер частиц в микронах, который делит распределение пополам. Значение, полученное при лазерной дифракции, более точно описывается как объемное распределение, и, следовательно, значение D_{50} , полученное с использованием этой методики, более достоверно относится к значению Dv_{50} (медианное для распределения по объему). Как используется в данном случае, значения Dv относятся к распределениям частиц по размерам, измеренным с использованием лазерной дифракции. Аналогично, значения D_{10} и D_{90} , используемые в контек-

сте лазерной дифракции, как считают, дают значения Dv_{10} и Dv_{90} и относятся к размеру частиц, при котором 10% распределения лежит ниже значения D_{10} , а 90% распределения лежит ниже значения D_{90} , соответственно.

Локальное введение в легкие также может быть достигнуто за счет использования сухого порошкового препарата. Сухой порошковый препарат будет содержать соединение изобретения в тонкоизмельченной форме, как правило, с масс-медианным аэродинамическим диаметром (ММАД (MMAD)) 1-10 мкм или D_{50} 0,5-10 мкм, например, около 1-5 мкм. Порошки соединения изобретения в тонкоизмельченной форме могут быть приготовлены с помощью процесса микронизации или аналогичного процесса уменьшения размера. Микронизация может быть осуществлена с использованием струйной мельницы, такой как мельницы, производимые Hosokawa Alpine. Полученное распределение частиц по размерам может быть измерено с использованием лазерной дифракции (например, с помощью прибора Malvern Mastersizer 2000S). Препарат, как правило, будет содержать приемлемый для локального применения разбавитель, такой как лактоза, глюкоза или маннит (предпочтительно лактоза), обычно с большим размером частиц, например, со значением ММАД 50 мкм или больше, например, 100 мкм или больше, или с D_{50} 40-150 мкм. Как используется в данном случае, определение "лактоза" относится к содержащему лактозу компоненту, включая моногидрат α -лактозы, моногидрат β -лактозы, безводную α -лактозу, безводную β -лактозу и аморфную лактозу. Лактозные компоненты могут быть переработаны микронизацией, просеиванием, помолем, прессованием, агломерацией или распылительной сушкой. Коммерчески доступные формы лактозы в различных формах также охватывают, например, препараты Lactohale® (лактоза для ингаляций; DFE Pharma), InhaLac®70 (просеянная лактоза для сухого порошкового ингалятора; Meggle), Pharmatose® (DFE Pharma) и Respitose® (просеянная лактоза для ингаляций; DFE Pharma). В одном варианте осуществления компонент лактозы выбирают из группы, включающей моногидрат α -лактозы, безводную α -лактозу и аморфную лактозу. Предпочтительной лактозой является моногидрат α -лактозы.

Сухие порошковые препараты также могут содержать другие наполнители, такие как стеарат натрия, стеарат кальция или стеарат магния.

Сухой порошковый препарат, как правило, доставляют с использованием сухого порошкового ингалятора (DPI). Примеры систем доставки сухого порошка включают СПИНХАЛЕР, ДИСКХАЛЕР, ТУРБОХАЛЕР, ДИСКУС и КЛИКХАЛЕР. Другие примеры систем доставки сухого порошка включают ECLIPSE, NEXT, РОТАХАЛЕР, ХАНДИХАЛЕР, АЭРОЛАЙЗЕР, ЦИКЛОХАЛЕР, БРИЗХАЛЕР/ NEOHALER, MONODOSE, FLOWCAPS, TWINCAPS, X-CAPS, ТУРБОСПИН, ELPENHALER, MIATHALER, ТВИСТХЕЙЛЕР, НОВОЛАЙЗЕР, ПРЕССЭЙР, ЭЛЛИПТА, ингалятор сухого порошка ORIEL, MICRODOSE, ПУЛВИНАЛ, ИЗИХЕЙЛЕР, УЛЬТРАХАЛЕР, ТАЙФУН, ПУЛЬМОДЖЕТ, OMNIALER, GYROHALER, TAPER, CONIX, XCELOVAIR и PROHALER.

В одном варианте осуществления соединение настоящего изобретения представлено в микронизированном сухом порошковом препарате, например, также содержащем лактозу подходящего качества необязательно вместе со стеаратом магния, которым заполнено одноразовое устройство, такое как АЭРОЛАЙЗЕР, или которым заполнено многоразовое устройство, такое как ДИСКУС.

Соединения настоящего изобретения также могут быть введены ректально, например, в форме свечей или клизм, которые включают водные или масляные растворы, а также суспензии и эмульсии. Такие композиции готовят, следуя стандартным методикам, хорошо известным специалисту в данной области техники. Например, свечи могут быть получены смешением активного ингредиента с обычной суппозиторной основой, такой как масло какао или другие глицериды, например, Suppocire. В этом случае лекарство смешивают с подходящим не раздражающим наполнителем, который является твердым при обычных температурах, но жидким при ректальной температуре, и поэтому будет плавиться в прямой кишке с высвобождением лекарства. Такие материалы представляют собой масло какао и полиэтиленгликоли.

Как правило, в случае композиций, предназначенных для введения локально в глаза в форме глазных капель или глазных мазей, общее количество ингибитора будет составлять приблизительно от 0,0001 и до менее чем 4,0% (мас./мас.).

Предпочтительно в случае локального офтальмологического введения композиции, вводимые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть приготовлены в виде растворов, суспензий, эмульсий и других дозированных лекарственных форм. Водные растворы обычно являются предпочтительными, исходя из простоты препарата, а также из-за возможности для больного легко вводить такие композиции путем закапывания одной-двух капель растворов в пораженные глаза. Однако композиции также могут представлять собой суспензии, вязкие или полу-вязкие гели, или другие типы твердых или полутвердых композиций. Свечи могут быть предпочтительными для соединений, которые умеренно растворимы в воде.

Композиции, вводимые в соответствии с настоящим изобретением, также могут включать различные другие ингредиенты, в том числе, но без ограничения, регулирующие тоничность агенты, буферы, поверхностно-активные вещества, стабилизирующие полимеры, консерванты, со-растворители и структурообразующие агенты. Предпочтительные фармацевтические композиции настоящего изобретения

включают ингибитор с регулирующим тоничность агентом и буфером. Фармацевтические композиции настоящего изобретения также необязательно могут включать поверхностно-активное вещество и/или успокоительное средство и/или стабилизирующий полимер.

Различные регулирующие тоничность агенты могут быть использованы для корректировки тоничности композиции, предпочтительно до тоничности естественных слез в случае офтальмологических композиций. Например, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид магния, хлорид кальция, простые сахара, такие как декстроза, фруктоза, галактоза, и/или простые полиолы, такие как сахароспирты, маннит, сорбит, ксилит, лактит, изомальтит, мальтит и гидролизаты гидрированного крахмала, могут быть добавлены к композиции до приблизительно физиологической тоничности. Такое количество регулирующего тоничность агента будет меняться в зависимости от конкретного добавляемого агента. В общем случае, однако, композиции будут содержать регулирующий тоничность агент в количестве, достаточном, чтобы получить конечную композицию, которая имеет офтальмологически приемлемую осмоляльность (обычно приблизительно 150-450 мОсм, предпочтительно 250-350 мОсм и наиболее предпочтительно приблизительно 290 мОсм). В общем случае регулирующие тоничность агенты настоящего изобретения будут присутствовать в интервале от 2 до 4% мас./мас. Предпочтительными регулирующими тоничность агентами являются простые сахара или сахароспирты, такие как D-маннит.

Соответствующие буферные системы (например, фосфат натрия, ацетат натрия, цитрат натрия, борат натрия или борная кислота) могут быть добавлены к композициям, чтобы предупредить смещение pH в условиях хранения. Конкретные концентрации будут меняться в зависимости от используемого агента. Предпочтительно, однако, буфер будет выбран так, чтобы сохранить целевое значение pH в интервале pH от 5 до 8 и более предпочтительно при целевом значении pH от 5 до 7.

Поверхностно-активные вещества необязательно могут быть использованы, чтобы создать более высокие концентрации ингибитора. Функция поверхностно-активных веществ состоит в солублизации ингибитора и стабилизации коллоидной дисперсии, такой как мицеллярный раствор, микроэмульсия, эмульсия и суспензия. Примеры поверхностно-активных веществ, которые необязательно могут быть использованы, включают полисорбат, полоксамер, полиоксил-40-стеарат, полиоксил касторового масла, тилоксапол, тритон и сорбитан монолаурат. Предпочтительные поверхностно-активные вещества, которые используют в настоящем изобретении, имеют гидрофильно/липофильный баланс (ГЛБ) в интервале от 12,4 до 13,2 и являются приемлемыми для офтальмологического применения, например, TritonX114 и тилоксапол.

Дополнительные агенты, которые могут быть добавлены к офтальмологическим композициям настоящего изобретения, представляют собой уменьшающие раздражение средства, которые функционируют как стабилизирующий полимер. Стабилизирующий полимер должен быть ионообменным полимером с предпочтением для локального офтальмологического применения, более конкретно, полимером, который несет отрицательный заряд на своей поверхности, который может проявлять зета-потенциал (-)10-50 мВ для физической стабильности, и способный давать дисперсию в воде (то есть, водорастворимый). Предпочтительный стабилизирующий полимер изобретения должен быть полиэлектролитом или полиэлектролитами, если присутствует больше чем один, из семейства поперечно сшитых полиакрилатов, таких как карбомеры, поликарбофил и пемулен(R) (Pemulen(R)), в частности, Carbomer 974p (полиакриловая кислота), при концентрации 0,1-0,5% мас./мас.

Другие соединения также могут быть добавлены к офтальмологическим композициям настоящего изобретения для повышения вязкости носителя. Примеры повышающих вязкость агентов включают, но без ограничения, полисахариды, такие как гиалуроновая кислота и ее соли, сульфат хондроитина и его соли, декстраны, различные полимеры семейства целлюлозы, виниловые полимеры и полимеры акриловой кислоты.

Типичные офтальмологические препараты, как правило, упаковывают в многоразовую форму. Следовательно, необходимы консерванты, чтобы предупредить микробное заражение во время применения. Подходящие консерванты включают: бензальконийхлорид, хлорбутанол, бензододецинийбромид, метилпарабен, пропилпарабен, фенилэтиловый спирт, динатрия эдентат, сорбиновую кислоту, поликватерний-1 и другие агенты, известные специалисту в данной области техники. Такие консерванты обычно используют на уровне от 0,001 до 1,0% мас./мас. Стандартные дозированные композиции настоящего изобретения будут стерильными, но, как правило, безконсервантными. Такие композиции, следовательно, обычно не будут содержать консерванты.

Практикующий врач или другой квалифицированный специалист будет способен определить подходящие дозировки для соединений изобретения и, следовательно, количество соединения изобретения, которое должно быть включено в любую конкретную фармацевтическую рецептуру (или в стандартную дозированную лекарственную форму или в другую форму).

Варианты осуществления изобретения, которые могут быть упомянуты в связи с комбинированными лекарственными препаратами, описанными выше в пункте (b), включают варианты, в которых другое терапевтическое средство представляет собой одно или несколько терапевтических средств, которые, как известно специалисту в данной области техники, являются приемлемыми для лечения воспалительных заболеваний (например, конкретных заболеваний, перечисленных ниже).

Например, для лечения респираторных нарушений (таких как ХОЗЛ или астма) другое терапевтическое средство представляет собой одно или несколько средств, выбираемых из списка, включающего:

стероиды (например, будесонид, беклометазона дипропионат, флутиказона пропионат, мометазона фураат, флутиказона фуорат; другим примером является циклесонид);

бета-агонисты, в частности, бета2-агонисты (например, тербуталин, салбутамол, салметерол, формотерол; другими примерами являются вилантерол, олодатерол, репротерол и фенотерол); и ксантины (например, теофиллин).

Например, для лечения респираторных нарушений (таких как ХОЗЛ или астма) другое терапевтическое средство представляет собой одно или несколько средств, выбираемых из списка, включающего:

мускариновые антагонисты (например, тиотропий, умеклидиний, гликопирроний, аклидиний и да-ротропий, любой из этих антагонистов, например, в виде бромид-соли); и ингибиторы фосфодиэстеразы.

Например, для лечения желудочно-кишечных нарушений (таких как болезнь Крона или неспецифический язвенный колит) другое терапевтическое средство представляет собой одно или несколько средств, выбираемых из списка, включающего:

5-аминосалициловую кислоту или ее пролекарство (например, сульфасалазин, олсалазин или бисалазид (bisalazide));

кортикостероиды (например, преднизолон, метилпреднизолон или будесонид);

иммуносупрессанты (например, циклоспорин, такролимус, метотрексат, азатиоприн или 6-меркаптопурин);

анти-TNF α антитела (например, инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб пегол или голимумаб);

анти-IL12/IL23 антитела (например, устекинумаб) или низкомолекулярные ингибиторы IL12/IL23 (например, апилимод);

анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела (например, ведолизумаб);

блокаторы MAdCAM-1 (например, PF-00547659);

антитела к $\alpha 4$ -интегрину молекулы клеточной адгезии (например, натализумаб);

антитела к α -субединице рецептора IL2 (например, даклизумаб или базиликсимаб);

ингибиторы JAK3 (например, тофацитиниб или R348);

ингибиторы Syk и их пролекарства (например, фостаматинид и R-406);

ингибиторы фосфодиэстеразы-4 (например, тетомиласт);

HMPL-0 04;

пробнотики;

дерсалазин;

семапимод/CP31-2364; и

ингибиторы протеинкиназы C (например, АЕВ-071).

Для лечения глазных нарушений (таких как увеит и сухой кератоконъюнктивит (сухость глаз)), другое терапевтическое средство может представлять собой, например, одно или несколько средств, выбираемых из списка, включающего:

кортикостероиды (например, дексаметазон, преднизолон,

триамцинолона ацетонид, дифлупреднат или флуоцинолона ацетонид);

агонисты глюкокортикоидов (например, мапракорат);

иммуносупрессанты (например, циклоспорин, воклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолата мофетил или такролимус);

анти-TNF α антитела (например, инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб пегол, ESBA-105 или голимумаб);

анти-IL-17A антитела (например, секукинумаб);

ингибиторы mTOR (например, сиролимус);

VGX-1027;

агонисты A3 рецептора аденозина (например, CF-101);

лифитеграт;

ингибиторы JAK3 (например, тофацитиниб или R348); и

ингибиторы протеинкиназы C (например, АЕВ-071).

В конкретных вариантах осуществления для лечения глазных нарушений (таких как увеит и сухой кератоконъюнктивит (сухость глаз)), другое терапевтическое средство может представлять собой, например, одно или несколько средств, выбираемых из списка, включающего:

кортикостероиды (например, дексаметазон, преднизолон, триамцинолона ацетонид, дифлупреднат или флуоцинолона ацетонид);

иммуносупрессанты (например, циклоспорин, воклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолата мофетил или такролимус);

анти-TNF α антитела (например, инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб пегол, ESBA-105 или голимумаб);

анти-IL-17A антитела (например, секукинумаб);
ингибиторы mTOR (например, сиролимус);
VGX-102 7;
ингибиторы JAK3 (например, тофацитиниб или R348); и
ингибиторы протеинкиназы C (например, АЕВ-071).

Медицинское применение

Соединение настоящего изобретения может быть использовано в качестве монотерапии в случае воспалительных заболеваний или при комбинированной терапии в случае таких заболеваний.

Таким образом, варианты осуществления описанных выше аспектов (е)-(g), которые могут быть упомянуты, включают варианты, в которых соединение формулы I (или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или изотопное производное) представляет собой единственный фармакологически активный ингредиент, используемый при лечении.

Однако в других вариантах осуществления описанных выше аспектов (е)-(g) соединение формулы I (или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или изотопное производное) вводят субъекту, которому также вводят одно или несколько терапевтических средств (например, где одно или несколько других терапевтических средств представляют собой средства, которые определены выше в связи с комбинированными лекарственными препаратами).

При использовании в данном изобретении определение "воспалительное заболевание" включает, в частности, ссылки на любое одно или несколько заболеваний из числа следующих:

(i) легочные заболевания или нарушения, имеющие воспалительный компонент, такие как кистозный фиброз, легочная гипертензия, саркоидоз легких, идиопатический легочный фиброз или, в частности, ХОЗЛ (включая хронический бронхит и эмфизему), астма или детская астма;

(ii) кожные заболевания или нарушения, имеющие воспалительный компонент, такие как атопический дерматит, аллергический дерматит, контактный дерматит или псориаз;

(iii) назальные заболевания или нарушения, имеющие воспалительный компонент, такие как аллергический ринит, ринит или синусит;

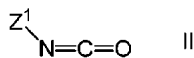
(iv) глазные заболевания или нарушения, имеющие воспалительный компонент, такие как конъюнктивит, аллергический конъюнктивит, глаукома, диабетическая ретинопатия, макулярный отек (включая диабетический макулярный отек), окклюзия центральной вены клетчатки (CRVO), сухая и/или влажная форма возрастной макулярной дегенерации сетчатки (AMD), послеоперационное воспаление после удаления катаракты или, в частности, сухой кератоконъюнктивит (сухость глаз), увеит (включая задний, передний и панувеит), отторжение роговичного и лимбального трансплантата; и

(v) желудочно-кишечные заболевания или нарушения, имеющие воспалительный компонент, такие как глютензависимая энтеропатия (глютеновая болезнь), эозинофильный эзофагит, интестинальная реакция "трансплантат против хозяина" или, в частности, болезнь Крона или неспецифический язвенный колит.

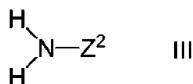
В данном случае ссылки на заболевания, имеющие воспалительный компонент, включают ссылки на заболевания, которые вызывают воспаление, независимо от того, имеют ли место или нет другие (не воспалительные) симптомы или последствия заболевания.

В соответствии с другим аспектом изобретения предложен способ получения соединения формулы I, и этот способ включает:

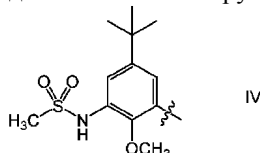
(a) взаимодействие соединения формулы II



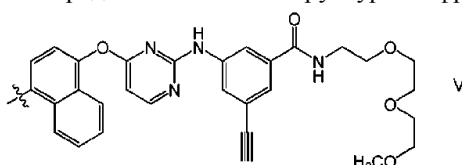
с соединением формулы III



где один из заместителей Z^1 и Z^2 представляет собой структурный фрагмент формулы IV:



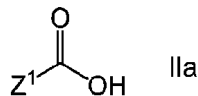
и другой заместитель из Z^1 и Z^2 представляет собой структурный фрагмент формулы V:



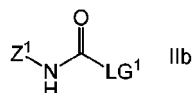
например, при условиях, известных специалисту в данной области техники, например, при темпе-

ратуре от комнатной температуры (например, от 15 до 30°C) до приблизительно 110°C в присутствии подходящего органического растворителя (например, полярного апротонного растворителя, такого как ДМФА, ТГФ, 1,4-диоксан или их смеси);

(b) взаимодействие соединения формулы IIa,

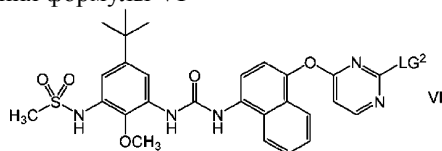


где Z^1 имеет значения, определенные выше, с подходящим азидобразующим агентом (то есть, с подходящим источником уходящей группы и активированного азид-иона, таким как дифенил-фосфоразидат; см., например, Tetrahedron 1974, 30, 2151-2157) в условиях, известных специалисту в данной области техники, например, при температуре от пониженной до комнатной температуры (например, от начальной температуры приблизительно от -5 до 5°C до комнатной температуры после реакции) в присутствии аминного основания (например, триэтиламина или пространственно-затрудненного основания, такого как N,N-диизопропилэтиламин) и подходящего органического растворителя (например, полярного апротонного растворителя, такого как ДМФА, ТГФ, 1,4-диоксан или их смеси), и за этой реакцией следует, без выделения, термическая перегруппировка (например, при нагревании) промежуточного ацилазида (формулы $Z^1-C(O)-N_3$), например, при комнатной температуре (например, от 15 до 30°C), с получением *in situ* соединения формулы II, и это соединение затем вводят в реакцию с соединением формулы III, которое определено выше, с получением соединения формулы I; (c) взаимодействие соединения формулы IIb

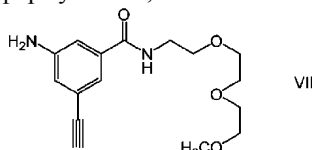


где LG^1 представляет собой подходящую уходящую группу (например, имидазолил, хлор или арилокси-группу, такую как фенокси-группа) и Z^1 имеет значения, определенные выше, с соединением формулы III, которое определено выше, например, при условиях, известных специалисту в данной области техники, например, при комнатной температуре (например, при температуре от комнатной температуры до 80°C, например, приблизительно при 60°C), необязательно в присутствии аминного основания (например, триэтиламина или пространственно-затрудненного основания типа N,N-диизопропилэтиламина) и подходящего органического растворителя (например, апротонного растворителя, такого как дихлорметан или сложный эфир, такой как изопропилацетат);

(d) взаимодействие соединения формулы VI

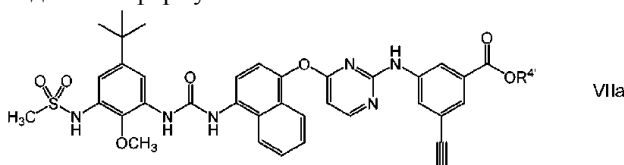


где LG^2 представляет собой подходящую уходящую группу (например, атом галогена, такой как атом хлора или брома), с соединением формулы VII,



например, при условиях, известных специалисту в данной области техники (например, как описано в публикации J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 15686-15696), например, при повышенной температуре (например, от 50 до 110°C) в присутствии подходящего органического растворителя (например, полярного апротонного растворителя, такого как ДМФА, ТГФ, 1,4-диоксан или их смеси) и необязательно в присутствии кислотного катализатора (например, сульфоновой кислоты, такой как паратолуолсульфоновая кислота); или через сочетание Бухвальда (Surty D.S.; Buchwald, S. L. Chem. Sci. 2011, 2, 27-50) с вовлечением палладиевого катализатора и соответствующего лиганда, например, BrettPhos; или

(e) взаимодействие соединения формулы VIIa



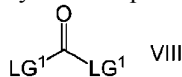
где R^4 представляет собой H или C_{1-3} -алкильную группу (например, метил), с соединением формулы VIIb



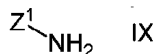
например, при условиях, известных специалисту в данной области техники, например, (i) когда $R^{4'}$ представляет собой C_{1-3} -алкильную группу, реакцию при комнатной температуре в присутствии подходящего катализатора, кислоты Льюиса, (например, триалкилалюминиевого реагента, такого как триметиалюминий) и апротонного органического растворителя (например, ТГФ); или (ii) когда $R^{4'}$ представляет собой H, реакцию в присутствии третичного аминного основания (например, триэтиламина, такого как триэтиламин или диизопропилэтиламин, или циклического амина, такого как N-метилпирролидин или N-метилморфолин), амидного (пептидного) сочетающего реагента (например, ТЗР, НАТУ, CDI, BOP, PyBOP, HOAt, NOBt или карбодиимида, такого как ДЦК (DCC) или диизопропилкарбодиимид) и апротонного органического растворителя (например, хлорированного растворителя, такого как ДХМ (DCM), сложного эфира, такого как этилацетат, амида диметиламина, такого как ДМФА, или смеси любых таких растворителей); или (iii) до реакции с соединением формулы VIIb превращение соединения формулы VIIa в соответствующее соединение, в котором группа $OR^{4'}$ замещена атомом галогена (например, хлором, и это соединение, например, может быть получено по реакции соединения формулы VIIa, в котором $R^{4'}$ представляет собой H, с галогенирующим агентом, таким как тионилхлорид, например, при повышенной температуре, например, от 50 до 70°C), после чего следует реакция полученного галогенангидрида с соединением формулы VIIb, и эта реакция, например, может быть проведена в присутствии апротонного органического растворителя (например, хлорированного растворителя, такого как ДХМ).

Соединения формулы II могут быть получены в соответствии с или по аналогии со способами, известными специалисту в данной области техники, например, по реакции соединения формулы IIa, которое определена выше, с азидобразующим агентом, после чего следует перегруппировка промежуточного ацилазида (как описано выше в (b); см., например, Tetrahedron 1974, 30, 2151-2157).

Соединения формулы IIb могут быть получены по реакции соединения формулы VIII



где LG^1 имеет определенные выше значения, с соединением формулы IX

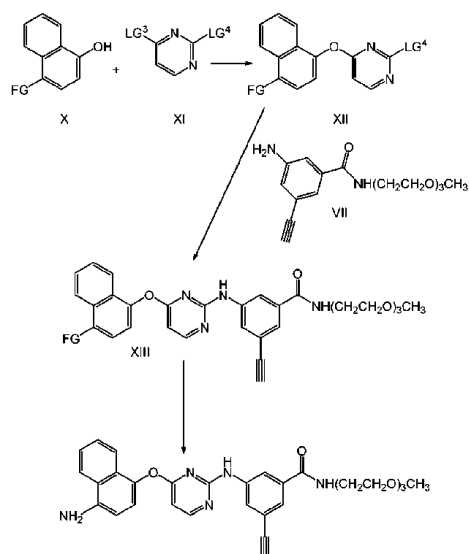


где Z^1 имеет определенные выше значения, например, при условиях, известных специалисту в данной области техники.

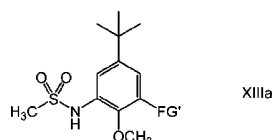
Амины формулы IX могут быть получены из карбоновых кислот формулы IIa по схеме, описанной выше в пункте (b), где промежуточный изоцианат II гидролизуют водой с получением карбаминовой кислоты, которая теряет диоксид углерода, давая соединение IX. Подобным же образом промежуточный изоцианат II может быть введен в реакцию со спиртом, таким как t-бутанол, с получением защищенного варианта соединения IX.

Соединения формулы III, в котором Z^2 представляет собой структурный фрагмент формулы V, или соединения формулы IX, в котором Z^1 представляет собой структурный фрагмент формулы V, могут быть синтезированы с использованием метода, описанного на схеме 1 (см., например: WO 2003/072569 и WO 2008/046216), где LG^3 и LG^4 представляют собой уходящие группы, например, галоген или метансульфонил, и FG представляет собой реальную или скрытую NH_2 -группу, то есть, группу, которая легко преобразуется в NH_2 -группу, такую как нитрогруппа или защищенный вариант NH-PG^2 , где PG^2 представляет собой типичную защитную группу (см., например: Greene, T.W.; Wuts, P.G.M. Protective Groups in Organic Synthesis; Wiley, 4th revised edition, 2006; ISBN-10: 0471697540), например, карбаматный эфир или карбоксамид. Последовательность реакций начинается при содействии основания с $\text{S}_\text{N}\text{Ar}$ замещения группы LG^3 в соединении XI ароматическими, полученными, когда соединение X обрабатывают основанием, чтобы получить простые эфиры XII. Оставшийся галогеновый или метансульфонильный заместитель (LG^4) простого эфира XII затем замещают i) амином формулы VII во второй $\text{S}_\text{N}\text{Ar}$ реакции или (ii) посредством сочетания Бухвальда (см., например, WO 2009/017838) с амином формулы VII с получением целевого соединения (где FG представляет собой NH_2) или соединения XIII (где FG представляет собой нитро-группу или NH-PG^2). Когда FG представляет собой нитро-группу в соединении XIII, NH_2 -группа может быть высвобождена с помощью реакции восстановления, как правило, проводимой посредством гидрирования с использованием подходящего катализатора, например, палладия на углеороде, или путем использования растворяющих металл условий, например, с железом в ледяной уксусной кислоте. С другой стороны, когда FG представляет собой защитную группу, NH_2 -группа может быть высвобождена по реакции снятия защитной группы. Хотя скрытая NH_2 -группа показана только как присутствующая на конечной стадии последовательности реакций, необходимо отметить, что высвобождение скрытой NH_2 -группы, представленной FG, может иметь место на любой стадии в методе синтеза, показанном на схеме 1.

Схема 1

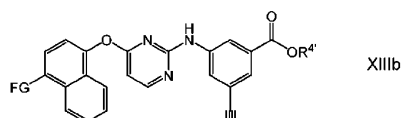


Аналогичным образом амины формулы IX, в которой Z^1 представляет собой структурный фрагмент формулы IV, могут быть синтезированы превращением скрытой группы в реальную NH_2 -группа в соединении формулы XIIIa



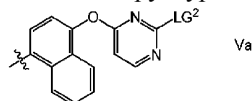
где группа FG' имеет значения, определенные выше для FG , за исключением того, что она не является NH_2 .

Соединения формулы III, в которых Z^2 представляет собой структурный фрагмент формулы V, или соединения формулы IX, в которых Z^1 представляет собой структурный фрагмент формулы V, могут быть получены по аналогии со способами, описанными в изобретении для получения соединений формулы I (см., выше способ (е)) и других соединений формулы III (см., например, выше схему 1), например, по реакции соединения формулы XIIIb

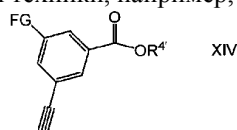


где FG и $R^{4'}$ имеют значения, определенные ранее, с соединением формулы VIIb, которое определено ранее, при условиях, известных специалисту в данной области техники (например, в условиях пептидного сочетания, описанных выше в связи со способом (е)), после чего следует превращение (если необходимо) группы FG в NH_2 -группа, например, как описано выше в связи со схемой 1.

Соединения формулы VI могут быть синтезированы по аналогии с соединением формулы I (см., например, выше альтернативные способы от (а) до (с)). Например, соединения формулы VI могут быть получены по реакции соединения формулы IX с соединением формулы IIIx, где соединения формул IX и IIIx имеют те же определения, что и соединения формул II и III, за исключением того, что один из заместителей Z^1 и Z^2 представляет собой структурный фрагмент формулы IV, которая определена выше, и другой из заместителей Z^1 и Z^2 представляет собой структурный фрагмент формулы Va



Соединение формулы VII может быть получено в соответствии с или по аналогии с методиками, известными специалисту в данной области техники, например, по реакции соединения формулы XIV



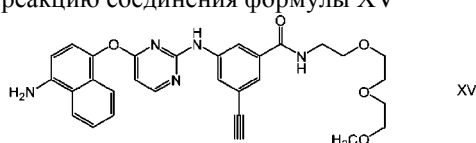
где FG имеет значения, определенные выше, с соединением формулы VIIb, которое определено выше, при условиях, известных специалисту в данной области техники (например, при условиях пептидного сочетания, описанных выше в связи со способом (е)), после чего следует, когда FG представляет

собой NH-PG², удаление PG² защитной группы, или, когда FG представляет собой NO₂, восстановление NO₂ до NH₂.

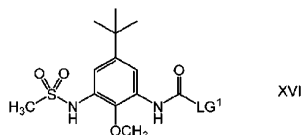
Специалисту в данной области техники будет понятно, что соединения, представленные формулами II, IX и Ib, представляют собой, как правило, реакционноспособные промежуточные соединения. Такие промежуточные соединения могут быть образованы *in situ* и введены в реакцию напрямую, без выделения, с соединениями формулы III с получением соединения формулы I. Кроме того, специалисту в данной области техники будет понятно, что может быть необходимо применение соответствующих защитных групп во время осуществления способов, описанных выше, для любых групп Z¹ и Z², которые имеют химически-чувствительные функциональные группы, например, гидроксильную группу или аминную функциональность.

Многие из соединений, представленных на схемах, являются или коммерчески доступными, или могут быть легко получены с использованием процитированных методик, или могут быть легко получены обычными способами, которые известны специалисту в данной области техники. См., например, публикации Regan, J. et al.; J. Med. Chem. 2003, 46, 4676-4686, WO 2000/043384, WO 2007/053346, WO 2007/087448, WO 2007/089512, WO 2009/117080 and WO 2014/027209.

Конкретный вариант осуществления изобретения относится к способу получения соединения формулы I, и этот способ включает реакцию соединения формулы XV

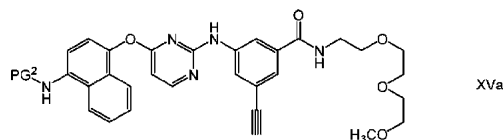


с соединением формулы XVI



где LG¹ имеет определенные выше значения (например, представляет собой фенокси-группу), например, при условиях, известных специалисту в данной области техники, например, при повышенной температуре (например, от 40 до 80°C, например, приблизительно при 60°C), в присутствии аминного основания (например, триэтиламина) и апротонного органического растворителя (например, сложного эфира, такого как изопропилацетат).

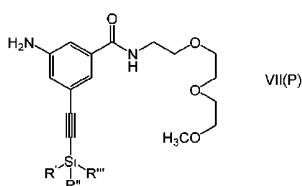
Соединение формулы XV может быть получено путем снятия защиты с соответствующего соединения формулы XVa,



где PG² имеет определенные выше значения (например, PG² представляет собой трет-бутоксикарбонил), например, при условиях, известных специалисту в данной области техники, например, когда PG² представляет собой трет-бутоксикарбонил, реакцией с сильной кислотой (например, алкил- или арилсульфоновой кислотой (например, п-толуолсульфоновой кислотой и/или, в частности, трифторуксусной кислотой) в присутствии апротонного органического растворителя (например, хлорированного растворителя, такого как ДХМ).

Соединение формулы XVa может быть получено реакцией соединения формулы VII, которое определено выше, с соединением формулы XII (например, с соединением формулы XII, в котором LG⁴ представляет собой атом хлора), которое определено ранее, но в котором FG представляет собой NH-PG² (например, NH-C(O)O-C(CH₃)₃), например, при условиях, известных специалисту в данной области техники, например, при повышенной температуре (например, от 40 до 80°C, например, между 60 и 70°C), в присутствии апротонного растворителя (например, в ТГФ) и необязательно кислого катализатора (например, сульфоновой кислоты, такой как пара-толуолсульфоновая кислота).

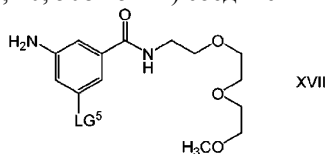
Соединение формулы VII может быть получено способами, такими как описанные выше способы. Например, соединение формулы VII может быть получено путем снятия защитной группы с соединения формулы VII(P)



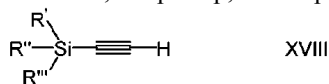
где R', R'' и R''' независимо представляют собой C₁₋₄-алкил (например, все заместители R', R'' и R''')

представляют собой изопропил), например, при условиях, известных специалисту в данной области техники, например, взаимодействием при обычной температуре в полярном апротонном растворителе (например, в ацетонитриле) с источником фторид-иона, таким как ТБАФ (ТВАФ) или фторид цезия.

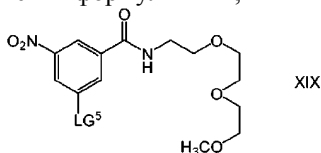
Соединение формулы VII(P) может быть получено сочетанием (например, по реакции сочетания Соногаширы; см. Chem. Soc. Rev. 2011, 40, 5084-5121) соединения формулы XVII



где LG⁵ представляет собой атом галогена, например, атом брома, с соединением формулы XVIII

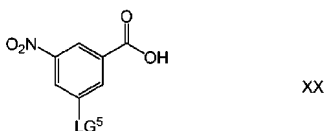


где R', R'' и R''' имеют определенные выше значения, например, при условиях, известных специалисту в данной области техники, например, реакцией при повышенной температуре (например, от 50 до 80°C или, в частности, от 60 до 70°C) в присутствии CuI и катализатора Pd(0) (например, Pd(PPh₃)₄) и инертного в реакции органического растворителя, такого как ТГФ. Соединение формулы XVII может быть получено восстановлением соединения формулы XIX,



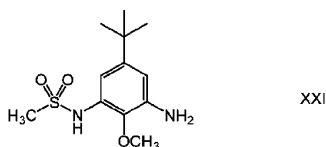
где LG⁵ имеет определенные выше значения, например, при условиях, известных специалисту в данной области техники, например, при повышенной температуре (например, при температуре приблизительно от 50 до 70°C) в атмосфере водорода (например, в атмосфере H₂ при давлении приблизительно 3 МПа) в присутствии подходящего катализатора (например, Pt/C), инертного в реакции растворителя (например, ТГФ) и кислоты (например, уксусной кислоты) или альтернативно с железом в кислой среде (например, в соляной кислоте) в воде и этаноле.

Соединение формулы XIX может быть получено реакцией соединения формулы XX

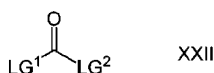


где LG⁵ имеет определенные выше значения, с галогенирующим агентом (например, с тионилхлоридом, например, при температуре от 60 до 70°C), после чего следует реакция промежуточного галогенангидрида с соединением формулы VIIb, которая определена выше, например, при условиях, известных специалисту в данной области техники, например, при 25°C или ниже в присутствии апротонного органического растворителя (например, ДХМ) и основания, например, триэтиламина, ДИПЭА (DIPEA) или NaHCO₃. С другой стороны, такое преобразование может быть выполнено конденсацией в присутствии третичного аминного основания (например, триалкиламина, такого как триэтиламин или ДИПЭА, или циклического амина, такого как N-метилпирролидин или N-метилморфолин), амидного (пептидного) сочетающего реагента (например, ТЗР, НАТУ, CDI, BOP, PyBOP, HOAt, HOBT или карбодиимид, такой как DCC или диизопропилкарбодиимид) и апротонного органического растворителя (например, хлорированного растворителя, такого как ДХМ, сложного эфира, такого как этилацетат, амида диметиламина, такого как ДМФА (DMF), или смеси любых таких растворителей).

Соединение формулы XVI может быть получено реакцией соединения формулы XXI (US2003/0065034)



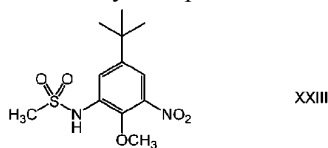
с соединением формулы XXII



где LG¹ и LG² представляют собой уходящие группы (например, LG¹ представляет собой фенокси-группу и LG² представляет собой атом галогена, такой как атом хлора), например, при условиях, известных специалисту в данной области техники, например, при температуре ниже приблизительно 20°C в присутствии основания (например, NaHCO₃) и инертного в реакции органического растворителя (напри-

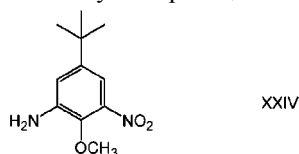
мер, ТГФ, ДХМ или, особенно, их смеси).

Соединение формулы XXI может быть получено реакцией соединения формулы XXIII



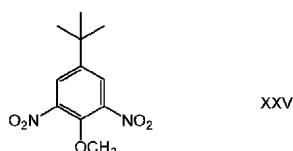
например, при условиях, известных специалисту в данной области техники, например, в атмосфере водорода (например, в атмосфере H_2 при давлении приблизительно от 0,3 до 0,4 МПа) в присутствии подходящего катализатора (например, Pd/C) и растворителя (например, метанола).

Соединение формулы XXI может быть получено реакцией соединения формулы XXIV



с метансульфонилхлоридом, например, при условиях, известных специалисту в данной области техники, например, при температуре между 25 и 40°C, в присутствии основания (например, пиридина) и инертного в реакции органического растворителя (например, толуола).

Соединение формулы XXIV может быть получено частичным восстановлением соединения формулы XXV



например, при условиях, известных специалисту в данной области техники, например, при повышенной температуре (например, при температуре от 70 до 80°C) в присутствии источника водорода (например, 4-метил-1-циклогексена), подходящего катализатора (например, Pd/C) и растворителя (например, спирта, такого как метанол, этанол или их смесь, такая как промышленный денатурат).

В конкретных вариантах осуществления изобретение относится к способу получения соединения формулы I, и этот способ включает:

(a) способ, описанный в изобретении, для получения соединения формулы XV; и/или

(b) способ, описанный в изобретении, для получения соединения формулы XVI.

В связи с этими вариантами осуществления изобретения способ получения соединения формулы I может включать способ, описанный в изобретении, для получения любого одного или нескольких соединений формул XVa, VII(P), VII, XVII, XIX, XXI, XXIII и XXIV.

Новые промежуточные соединения, описанные в изобретении, образуют аспект изобретения. В этой связи еще один аспект изобретения относится к соединению формулы XVI, которое определено ранее (например, к соединению формулы XVI, в котором LG^1 представляет собой феноксигруппу).

Аспекты изобретения, описанные в настоящем документе (например, упомянутые выше соединения, комбинации, способы и варианты применения), могут иметь преимущество в том, что при лечении состояний, описанных в изобретении, они могут быть более удобными для врача и/или пациента, более эффективными, менее токсичными, могут иметь лучшую селективность, иметь более широкий спектр активности, быть более сильнодействующими, давать меньше побочных эффектов, иметь улучшенный фармакокинетический и/или фармакодинамический профиль, могут иметь более подходящую морфологию твердого состояния, иметь улучшенную долговременную стабильность или могут иметь другие полезные фармакологические свойства в сравнении с аналогичными соединениями, комбинациями, способами (способами лечения) или вариантами применения, которые известны из предшествующего уровня техники для применения при лечении этих состояний или других состояний.

Соединения настоящего изобретения дополнительно (или альтернативно) могут

проявлять длительную продолжительность действия и/или устойчивость действия (например, в сравнении с другими ранее открытыми ингибиторами p38 MAP-киназы, такими как, например, BIRB796);

не сильно ингибировать GSK 3 α ;

воздействовать на меньшую часть кинома, то есть, действовать с улучшенной селективностью, что иллюстрируется пониженными показателями KinomeScan Selectivity Scores;

поддерживать относительно высокую локальную концентрацию лекарства между приемами доз (например, высокую локальную концентрацию относительно других ранее открытых ингибиторов p38 MAP-киназы, таких как, например, BIRB796);

проявлять свойства, которые особенно приемлемы для локального/местного введения (например,

после локального/местного введения обеспечение высоких концентраций в желаемой ткани, но низких концентраций в плазме, соединений формулы (I) и/или быстрое выведение соединений формулы (I) из плазмы, например, в результате высокого почечного или печеночного выведения);

проявлять незначительную индукцию β -катенина и/или незначительное ингибирование митоза в клетках или их отсутствие;

не продуцировать рост двухъядерных клеток, содержащих микроядра, в лимфоцитах человека в *in vitro* микроядерном тесте;

проявлять незначительное зависимое от времени ингибирование членов суперсемейства цитохрома P450 или его отсутствие;

демонстрировать улучшенную химическую стабильность в присутствии воды (например, устойчивость к гидролизу в водных смесях при повышенных температурах) по сравнению с ранее открытыми ингибиторами p38 MAP-киназы, такими как, например, BIRB796);

после введения пациенту вызывать образование метаболитов, незначительно связанных или не ассоциирующихся с проблемой безопасности (например, с токсичностью);

проявлять хорошую растворимость и/или клеточную проницаемость;

иметь высокую степень кристалличности; и/или

проявлять незначительную гигроскопичность или ее отсутствие в твердом состоянии.

Экспериментальные способы

Общие методики

Все исходные материалы и растворители получены из коммерческих источников или приготовлены в соответствии с цитируемыми литературными источниками. Если не указано другое, все реакции проводят с перемешиванием. Органические растворители сушат в установленном порядке над безводным сульфатом магния. Микроволновые реакции проводят в микроволновом реакторе CEM Discover и Smith-creator, нагретом до постоянной температуры с использованием микроволнового излучения переменной мощности.

Колонную хроматографию с нормальными фазами в установленном порядке проводят на автоматизированной системе флэш-хроматографии, такой как CombiFlash Companion или CombiFlash RF, с использованием набитых силикагелем (230–400 меш, 40–63 мкм) картриджей. Катионообменную смолу SCX приобретают у Supelco и перед использованием обрабатывают 1M соляной кислотой. Если не указано другое, реакционную смесь, которую необходимо очистить, вначале разбавляют MeOH и подкисляют несколькими каплями AcOH. Этот раствор загружают непосредственно на SCX и промывают MeOH. Целевой материал затем элюируют путем промывания с помощью 1%-ного раствора NH_3 в MeOH.

Аналитические методы

Аналитическую ВЭЖХ проводят с использованием прибора Waters Xselect CSH C18, 2,5 мкм, колонка 4,6×30 мм, элюируя с градиентом 0,1%-ной муравьиной кислоты в MeCN в 0,1%-ной водной муравьиной кислоте, или прибора Waters Xbridge BEH C18, 2,5 мкм, колонка 4,6×30 мм, элюируя с градиентом MeCN в водном 10 mM растворе бикарбоната аммония. УФ-спектры элюированных пиков измеряют с использованием или диодно-матричного детектора, или детектора с переменной длиной волны на системе Agilent 1100.

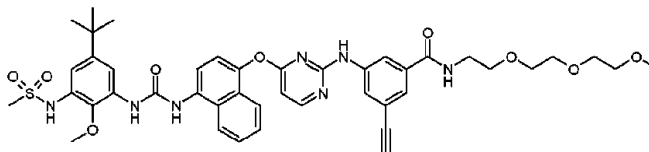
Аналитическую ЖХ-МС проводят с использованием прибора Waters Xselect CSH C18, колонка 2,5 мкм, 4,6×30 мм, элюируя с градиентом 0,1%-ной муравьиной кислоты в MeCN в 0,1%-ной водной муравьиной кислоте, или Waters Xbridge BEH C18, 2,5 мкм, колонка 4,6×30 мм, элюируя с градиентом MeCN в водном 10 mM растворе бикарбоната аммония. УФ- и масс-спектры получают с использованием детектора с переменной длиной волны или на системе Agilent 1200 или на системе Agilent Infinity 1260 LCMS с 6120 одноквадрольным масс-спектрометром с электрораспылением с регистрацией положительных и отрицательных ионов.

Препаративную ВЭЖХ проводят с использованием прибора Waters Xselect CSH C18, 5 мкм, колонка 19×50 мм, с использованием любого градиента или 0,1%-ной муравьиной кислоты в MeCN в 0,1%-ной водной муравьиной кислоте, или градиента MeCN в водном 10 mM растворе бикарбоната аммония, или с использованием прибора Waters Xbridge BEH C18, 5 мкм, колонка 19×50 мм, с использованием градиента MeCN в водном 10 mM растворе бикарбоната аммония. Фракции собирают, затем детектируют с помощью УФ при одной длине волны, измеренной детектором с переменной длиной волны, на препаративной ВЭЖХ Gilson 215 или препаративной ВЭЖХ Varian PrepStar, или по массе и УФ при одной длине волны, измеренных с помощью ZQ одноквадрольного масс-спектрометра с электрораспылением с регистрацией положительных и отрицательных ионов и двухволнового детектора на приборе Waters FractionLynx LCMS.

Спектроскопия ^1H ЯМР: Спектры ^1H ЯМР получают на спектрометре Bruker Avance III при 400 МГц. Любой из центральных сигналов хлороформа- d , диметилсульфоксида- d_6 или внутреннего стандарта, тетраметилсилана, используют в качестве стандарта сравнения.

Примеры

Пример 1. 3-((4-((4-(3-(5-(трет-Бутил)-2-метокси-3-(метилсульфонамидо)фенил)уреидо)нафталин-1-ил)окси)пиримидин-2-ил)амино)-5-этинил-N-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этил)бензамид (соединение I)



(i) 3-Бром-N-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этил)-5-нитро-бензамид.

Медленно добавляют ТЗР, 50 мас.%, в EtOAc (25 мл, 42,0 ммоль) к раствору 3-бром-5-нитробензойной кислоты (7,05 г, 28,7 ммоль), 2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этанамин (4 г, 24,25 ммоль) и Et₃N (12 мл, 86 ммоль) в EtOAc (50 мл), погруженному при этом в ледяную баню. По окончании добавления ледяную баню убирают и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре 2 ч. Смесь распределяют между насыщенным водным раствором NaHCO₃ (100 мл) и EtOAc (100 мл). Органический слой промывают водным раствором K₂CO₃ (10 г в 100 мл) и рассолом (100 мл), затем сушат (MgSO₄), фильтруют и концентрируют в вакууме, получают соединение подзаголовка (8,23 г) в виде коричневого масла.

Спектр ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆), δ: 9,02 (т, 1H), 8,65-8,64 (м, 1H), 8,53 (т, 1H), 8,46 (т, 1H), 3,57-3,43 (м, 10H), 3,41-3,38 (м, 2H), 3,21 (с, 3H). ЖХ-МС m/z: 391/393 (M+H)⁺ (ES⁺); 389/391 (M-H)⁻ (ES⁻).

(ii) 3-Амино-5-бром-N-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этил)бензамид.

Порошок железа (5,90 г, 106 ммоль) добавляют к раствору продукта со стадии (i) (8,24 г, 20,43 ммоль) и конц. HCl (2 мл, 23,40 ммоль) в EtOH (65 мл) и воде (15 мл). Смесь нагревают при 75°C (температура блока) в течение 1 ч. Затем реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, разбавляют водой (30 мл), фильтруют и концентрируют в вакууме. Остаток подщелачивают (NaHCO₃), затем распределяют между EtOAc (350 мл) и водой (275 мл). Органический слой сушат (MgSO₄), фильтруют и концентрируют в вакууме, получают оранжевое масло, которое очищают хроматографией на силикагеле (колонка 220 г, 0-5% MeOH в ДХМ) получают соединение подзаголовка (5,25 г) в виде оранжевого масла.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆), δ: 8,36 (т, 1H), 7,07 (т, 1H), 7,00-6,99 (м, 1H), 6,84 (т, 1H), 5,57 (с, 2H), 3,52-3,48 (м, 8H), 3,42-3,39 (м, 2H), 3,35 (кв., 2H), 3,22 (с, 3H). ЖХ-МС m/z: 361/363 (M+H)⁺ (ES⁺).

(iii) 3-Амино-N-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этил)-5-((триизопропилсиллил)этинил)бензамид.

К обезгаженному раствору продукта со стадии (ii) (5,06 г, 13,31 ммоль), этинилтриизопропилсилана (4,5 мл, 20,06 ммоль), Cu(I)I (130 мг, 0,683 ммоль) и Et₃N (8 мл, 57,4 ммоль) в ДМФА (45 мл) добавляют Pd(PPh₃)₄ (770 мг, 0,666 ммоль). Реакционную смесь нагревают при 85°C в течение 3 часов, затем охлаждают до комнатной температуры и распределяют между EtOAc (250 мл) и рассолом (250 мл). Водную фазу дополнительно экстрагируют EtOAc (250 мл), затем объединенные органические экстракты промывают водой (3×200 мл) и рассолом (200 мл), сушат (MgSO₄), фильтруют и концентрируют в вакууме, получают темно-коричневое масло. Сырой продукт очищают хроматографией на силикагеле (колонка 220 г, 0-3% MeOH в ДХМ), получают соединение подзаголовка (5,4 г) в виде оранжевого масла.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆), δ: 8,39 (т, 1H), 7,06-7,03 (м, 2H), 6,79-6,78 (м, 1H), 5,43 (с, 2H), 3,54-3,49 (м, 8H), 3,41-3,33 (м, 4H), 3,21 (с, 3H), 1,10 (с, 21H). ЖХ-МС m/z: 463 (M+H)⁺ (ES⁺).

(iv) 3-Амино-5-этинил-N-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этил)бензамид.

При перемешивании к раствору продукта со стадии (iii) (5,33 г, 11,40 ммоль) в EtOAc (75 мл) добавляют 1М ТБАФ (ТБАФ) в ТГФ (11,40 мл, 11,40 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре 1 ч, затем распределяют между водой (300 мл) и EtOAc (400 мл), водную фазу дополнительно экстрагируют EtOAc (300 мл). Объединенные органические экстракты промывают рассолом (400 мл), затем сушат (MgSO₄), фильтруют и концентрируют, получают оранжевое масло. Сырой продукт растворяют в минимальном количестве MeOH и загружают на колонку SCX. Колонку элюируют MeOH (3 объема колонки), затем 1%-ным раствором NH₃ в MeOH (3 объема колонки). Содержащие продукт фракции концентрируют в вакууме, получают соединение подзаголовка (3,27 г) в виде коричневого масла.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆), δ: 8,38 (т, 1H), 7,06-7,04 (м, 2H), 6,75-6,74 (м, 1H), 5,46 (с, 2H), 4,09 (с, 1H), 3,53-3,48 (м, 8H), 3,41-3,39 (м, 2H), 3,37-3,33 (м, 2H), 3,21 (с, 3H). ЖХ-МС m/z: 307 (M+H)⁺ (ES⁺).

(v) трет-Бутил-(4-((2-((3-этинил-5-((2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этил)карбамоил)фенил)амино)пиримидин-4-ил)окси)-нафталин-1-ил)карбамат.

К раствору продукта со стадии (iv) (1 г, 3,13 ммоль) и трет-бутил-(4-((2-хлорпиримидин-4-ил)окси)нафталин-1-ил)-карбамата (см., например, Ito, K. et al., WO 2010/067130, 17 июня 2010; 777 мг, 2,090 ммоль) в ДМФА (60 мл) при перемешивании добавляют моногидрат п-ТСК (pTSA) (200 мг, 1,051 ммоль). Полученный раствор перемешивают при 60°C в течение 72 ч. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, затем распределяют между EtOAc (150 мл) и насыщенным водным раствором

NaHCO₃ (100 мл). Водный слой дополнительно экстрагируют EtOAc (2×150 мл), затем объединенные органические экстракты промывают водой (3×200 мл) и рассолом (200 мл), затем сушат (MgSO₄), фильтруют и концентрируют, получают оранжевое масло (1,17 г). Сырой продукт очищают хроматографией на силикагеле (80 г колонка, 0-5% MeOH в EtOAc) получают соединение подзаголовка (552 мг) в виде светло-коричневой пены.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆), δ: 9,73 (с, 1H), 9,29 (с, 1H), 8,46-8,43 (м, 2H), 8,11-8,09 (м, 2H), 7,92-7,88 (уш. м, 1H), 7,83-7,80 (м, 1H), 7,62-7,53 (м, 3H), 7,56-7,55 (м, 1H), 7,42 (д, 1H), 6,57 (д, 1H), 4,14 (с, 1H), 3,54-3,48 (м, 8H), 3,40-3,35 (м, 4H), 3,20 (с, 3H), 1,52 (с, 9H). ЖХ-МС m/z: 642 (M+H)⁺ (ES⁺)

(vi) 3-((4-((4-Аминонафталин-1-ил)окси)пиримидин-2-ил)амино)-5-этинил-N-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этил)бензамид.

К раствору продукта со стадии (v) (540 мг, 0,825 ммоль) в ДХМ (8 мл) при перемешивании добавляют ТФУК (3,2 мл, 41,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре 1 ч. Раствор концентрируют в вакууме, полученное масло растворяют в минимальном количестве MeOH и загружают на колонку SCX. Колонку элюируют MeOH (3 объема колонки), затем 1%-ным раствором NH₃ в MeOH (3 объема колонки). Содержащую продукт часть концентрируют в вакууме, получают соединение подзаголовка (405 мг) в виде светло-коричневого масла.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆), δ: 9,73 (с, 1H), 8,45 (т, 1H), 8,36 (д, 1H), 8,14-8,10 (м, 1H), 8,07-8,05 (уш. м, 1H), 7,94-7,92 (уш. м, 1H), 7,65-7,61 (м, 1H), 7,47-7,40 (м, 3H), 7,15 (д, 1H), 6,72 (д, 1H), 6,37 (д, 1H), 5,87 (уш. с, 2H), 4,17 (с, 1H), 3,54-3,48 (м, 8H), 3,40-3,36 (м, 4H), 3,20 (с, 3H). ЖХ-МС m/z: 542 (M+H)⁺ (ES⁺).

(vii) Фенил-(5-(трет-бутил)-2-метокси-3-(метилсульфонамидо)фенил)карбамат.

Фенилхлорформат (0,5 мл, 3,99 ммоль) при перемешивании добавляют к раствору N-(3-амино-5-(трет-бутил)-2-метоксифенил)метансульфонамида (см., например, Cirillo, P. F. et al., WO 2002/083628, 24 October 2002; 1 г, 3,67 ммоль) и NaHCO₃ (620 мг, 7,38 ммоль) в ТГФ (10 мл) и ДХМ (10 мл). Смесь перемешивают 2 ч, затем добавляют воду (20 мл). Органический слой отделяют, сушат (MgSO₄), фильтруют и упаривают, получают коричневую пену, которую перемешивают в циклогексане (20 мл), получают соединение подзаголовка (1,4 г) в виде бесцветного твердого вещества.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆), δ: 9,49 (с, 1H), 9,14 (с, 1H), 7,56 (с, 1H), 7,50-7,37 (м, 2H), 7,31-7,13 (м, 4H), 3,77 (с, 3H), 3,06 (с, 3H), 1,25 (с, 9H). ЖХ-МС m/z: 393 (M+H)⁺ (ES⁺); 391 (M-H)⁻ (ES⁻).

(viii) 3-((4-((4-(3-(5-(трет-Бутил)-2-метокси-3-(метилсульфонамидо)фенил)уреидо)нафталин-1-ил)окси)пиримидин-2-ил)амино)-5-этинил-N-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этил)бензамид.

При перемешивании смесь фенил-(5-(трет-бутил)-2-метокси-3-(метилсульфонамидо)фенил)карбамата (см. выше стадию I(vii); 95 мг, 0,239 ммоль), продукта со стадии (vi) (120 мг, 0,217 ммоль) и Et₃N (6 мкл, 0,043 ммоль) в i-PrOAc (3 мл) нагревают при 70°C в течение ночи. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и концентрируют в вакууме. Остаток очищают хроматографией на силикагеле (колонка 40 г, 0-5% MeOH в EtOAc), получают масло, которое растирают с диэтиловым эфиром, получают светло-бежевое твердое вещество. Сырой продукт очищают препаративной ВЭЖХ (Varian, основная (10 mM бикарбонат аммония), Waters X-Bridge Prep-C18, 5 мкм, колонка 19×50 мм, 35-70% MeCN в воде), получают названное соединение (69 мг) в виде почти белого твердого вещества.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆), δ: 9,74 (с, 1H), 9,32 (с, 1H), 9,13 (с, 1H), 8,89 (с, 1H), 8,46-8,43 (м, 2H), 8,26 (д, 1H), 8,17 (д, 1H), 8,09-8,07 (м, 2H), 7,87-7,83 (м, 2H), 7,69-7,65 (м, 1H), 7,61-7,57 (м, 1H), 7,45-7,43 (м, 2H), 7,02 (д, 1H), 6,55 (д, 1H), 4,11 (с, 1H), 3,80 (с, 3H), 3,53-3,47 (м, 8H), 3,40-3,35 (м, 4H), 3,20 (с, 3H), 3,09 (с, 3H), 1,26 (с, 9H). ЖХ-МС m/z: 840 (M+H)⁺ (ES⁺); 838 (M-H)⁻ (ES⁻).

Пример 2. 3-((4-((4-(3-(5-(трет-Бутил)-2-метокси-3-(метилсульфонамидо)фенил)уреидо)нафталин-1-ил)окси)пиримидин-2-ил)амино)-5-этинил-N-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этил)бензамид (соединение I).

(i) 3-Бром-N-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этил)-5-нитробензамид.

В колбу объемом 10 л, оборудованную скруббером с атмосферой азота, добавляют 3-бром-5-нитробензойную кислоту (2686 г, 10,91 моль) и тионилхлорид (5,37 л, 75,8 моль).

Реакционную смесь нагревают до 68°C (выделение газа) и затем перемешивают при 60°C в течение ночи, после чего анализ с помощью ЖХ указывает на окончание реакции. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и концентрируют в вакууме, получают 3,2 кг материала, количество которого указывает на присутствие тионил-хлорида (выход 100%=2,88 кг). Смесь концентрируют из толуола (2×3 л), чтобы удалить все следы тионилхлорида. Получено суммарное количество хлорангидрида 3370 г, причем избыточный выход объясняется наличием толуола.

В колбу объемом 20 л с атмосферой азота добавляют 2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этанамин (890 г, 5,45 моль) и ДХМ (3,5 л). После этого добавляют 8%-ный водный раствор NaHCO₃ (9л). Затем к смеси добавляют хлорангидрид (1373 г активного компонента, 4,89 моль), поддерживая при этом температуру ниже 25°C

(экзотерма и выделение газа). Смесь перемешивают 30 минут, после чего данные ЖХ указывают на окончание реакции. Органическую часть отделяют и промывают 1M HCl (4,5 л) и 8%-ным водным рас-

твором NaHCO_3 (4,5 л), затем сушат, фильтруют и концентрируют в вакууме, получают суммарно 1956 г соединения подзаголовка (выход 95%). Данные ^1H ЯМР указывают на чистоту продукта >95%.

(ii) 3-Амино-5-бром-N-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этил)бензамид.

Продукт со стадии (i) (1 кг, 2,56 моль) растворяют в ТГФ (3,5 л) и AcOH (500 мл) и гидрируют при давлении H_2 3 МПа (30 бар) при температуре до 60°C с использованием 5% Pt/C (30 г, тип JM 18 MA, 55% воды). Данные анализа через 5 ч показывают соотношение 1:1 для ArNHON и ArNH_2 . Реакция завершается после выдерживания в течение ночи, причем данные ^1H ЯМР показывают присутствие 3% побочного продукта без брома. Катализатор отфильтровывают, затем остаток разбавляют этилацетатом (3 л) и промывают 20%-ным раствором карбоната калия (3,5 л). Органическую часть затем сушат, фильтруют и концентрируют в вакууме, получают остаток, который затем суспендируют в 5 объемах диэтилового эфира в течение ночи, чтобы уменьшить количество образцов без атома брома (<2% после суспендирования). Получают соединение подзаголовка с выходом 90% с чистотой 86% (по данным ЖХ).

(iii) 3-Амино-N-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этил)-5-((триизопропилсилил)этинил)бензамид.

В колбу объемом 10 л в атмосфере азота добавляют продукт со стадии (ii) (700 г, 1,93 моль) и ТГФ (5,59 л). После этого добавляют CuI (19,2 г, 0,1 моль), триэтиламин (1,29 л, 9,27 моль) и этинилтриизопропилсилан (389 г, 2,13 моль). Реакционную смесь обезгаживают и продувают азотом три раза. Добавляют $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (125,5 г, 0,198 моль) и реакционную смесь обезгаживают и продувают азотом. Реакционную смесь нагревают при 65°C в течение ночи, после чего данные ЖХ указывают на 91% продукта и <1% исходного материала. Реакционную смесь концентрируют в вакууме, затем остаток забирают в этилацетат (2 л) и пропускают через слой диоксида кремния (2 кг), элюируя дополнительным количеством этилацетата (30 л). Содержащие продукт фракции концентрируют в вакууме, затем сырой продукт растворяют в ТВМЕ (5л) и экстрагируют бн. HCl (5л). Фазу водной HCl промывают ТВМЕ (2×5 л), затем подщелачивают 6 н. раствором NaOH до pH 9-10. Продукт затем экстрагируют ТВМЕ (2×5 л), органические фазы сушат, фильтруют и концентрируют в вакууме, получают 635 г соединения подзаголовка с чистотой >95% (данные ^1H ЯМР, исключая растворители).

(iv) 3-Амино-5-этинил-N-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этил)бензамид.

К продукту со стадии (iii) (1200 г, 2,59 моль) в MeCN (8,8 л) добавляют CsF (433,6 г, 2,85 моль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи, после чего данные ВЭЖХ показывают 1,7% продукта, 97,4% исходного материала. Загружают дополнительное количество CsF (420 г, 2,76 моль) и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи, после чего данные ВЭЖХ показывают 91,0% продукта, 4,4% исходного материала. Смесь фильтруют и фильтрат концентрируют в вакууме, получают материал, который содержит 92,5% продукта, 0,7% исходного материала (данные ВЭЖХ). Остаток растворяют в ДХМ (3 л) и EtOAc (3 л), затем делят на две равные порции. Каждую порцию пропускают через слой диоксида кремния (1,6 кг), элюируя EtOAc (50 л). Фильтраты объединяют и концентрируют в вакууме. Сырой материал промывают гептаном (2×4 л) для удаления силильных примесей. Выделяют суммарно 719 г соединения подзаголовка (83% (по данным ^1H ЯМР), выход активного компонента 75%, 597 г).

(v) трет-Бутил-4-((2-((3-этинил-5-((2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этил)карбамоил)фенил)амино)пиримидин-4-ил)окси)нафталин-1-ил)карбамат.

В атмосфере N_2 загружают продукт со стадии (iv) (301,2 г, 250,0 г активного компонента, 0,816 моль), трет-бутил-4-((2-хлорпиримидин-4-ил)окси)нафталин-1-ил)карбамат (см. выше, например, Ito, K. et al., WO 2010/067130, 17 июня 2010; 252,8 г, 0,680 моль), $\text{p-TSC-N}_2\text{O}$ (24,7 г, 0,130 моль) и ТГФ (7600 мл). Темно-красный раствор нагревают при кипении с обратным холодильником 6 ч, затем охлаждают до комнатной температуры, после чего данные ВЭЖХ указывают на 0,25% продукта стадии (iv), 22,24% продукта стадии (vi), 8,98% хлорпиримидинового исходного материала и 64,08% продукта со стадии (v). Загружают дополнительное количество продукта со стадии (iv) (27,1 г, 22,5 г активного компонента, 73,4 ммоль), реакционную смесь снова нагревают до кипения с обратным холодильником и кипятят в течение ночи, данные ВЭЖХ в дальнейшем указывают на 0,20% продукта со стадии (iv), 30,23% продукта со стадии (vi), 4,50% исходного хлорпиримидина и 58,61% продукта со стадии (v).

Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и гасят реакцию с помощью 20%-ного раствора K_2CO_3 (735 мл), затем слои разделяют, затем органический слой промывают насыщенным раствором (880 мл). Органический слой сушат над MgSO_4 , фильтруют и концентрируют, выделяют коричневое липкое твердое вещество. Выход=491,2 г (93,8%). Данные ВЭЖХ дают 30,59% продукта стадии (VI) и 59,50% продукта стадии (v), и данные спектров ^1H ЯМР подтверждают структуру.

(vi) 3-(((4-(4-Аминонафталин-1-ил)окси)пиримидин-2-ил)амино)-5-этинил-N-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этил)бензамид.

В атмосфере N_2 загружают смесь сырых продуктов со стадии (v) (491,2 г) и ДХМ (3700 мл). По каплям добавляют ТФУК (695 мл, 12,3 эквивалента), при этом температуру поддерживают ниже 20°C . Темно-коричневый раствор перемешивают при комнатной температуре в течение ночи, после чего данные ВЭЖХ указывают на 86,90% продукта стадии (vi) и 0,94% продукта стадии (v). Смесь концентрируют и остаток забирают в EtOAc (3700 мл), затем промывают насыщенным водным раствором NaHCO_3 (2×2000

мл), пока не будет достигнуто значение pH 7-8. Органический слой сушат над MgSO_4 , фильтруют и концентрируют, выделяют фиолетовое твердое вещество. Выход = 360,8 г. Чистота 78,58% (данные ВЭЖХ). (vii) 5-трет-Бутил-2-метокси-3-нитроанилин в атмосфере N_2 загружают 4-трет-бутил-2,6-динитроанизол (620 г, 2,439 моль), IMS (4774 мл) и 10% Pd/C (31,8 г). Реакционную смесь нагревают до кипения с обратным холодильником (78°C) и по каплям в течение 4,5 ч добавляют 4-метил-1-циклогексен (500 мл, 4,159 моль). Реакционную смесь перемешивают при кипении с обратным холодильником в течение ночи, после чего данные ВЭЖХ указывают на 72,13% продукта и 27,17% исходного материала. Дополнительное количество 4-метил-1-циклогексена (160 мл, 1,331 моль) добавляют по каплям в течение 3 ч и реакционную смесь перемешивают при кипении с обратным холодильником 72 ч. Данные ВЭЖХ указывают на 92,72% продукта и 0% исходного материала. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, катализатор удаляют посредством вакуумного фильтрования и промывают IMS (500 мл). Растворители концентрируют приблизительно до 1200 мл, получают соотношение 1:4,45 продукта к этанолу (целевое 1:5). К остатку загружают по каплям 2M HCl (124 мл), поддерживая при этом температуру ниже 23°C. Загружают воду (3100 мл) и полученную суспензию перемешивают при комнатной температуре 1,5 часа. Твердое вещество отфильтровывают посредством вакуумного фильтрования и промывают водой (2×1000 мл). Полученные оранжевые иголки сушат в вакууме при 40°C в течение ночи. Выход = 475,2 г (86,9%). Чистота >97% (данные спектров ^1H ЯМР). Чистота 98,8% (данные ВЭЖХ). KF 0,36%.

(viii) N-(5-трет-Бутил-2-метокси-3-нитрофенил)метансульфонамид.

В атмосфере N_2 загружают продукт стадии (vii) (471 г, 2,099 моль), толуол (1880 мл) и пиридин (471 мл), затем по каплям в течение 1 ч добавляют метансульфонилхлорид (179 мл), поддерживая температуру ниже 35°C. Реакционную смесь перемешивают при 30-35°C в течение ночи, затем охлаждают до температуры ниже 20°C, загружают воду (1880 мл) и 2M HCl (1880 мл) (до pH 3). Слои разделяют и органическую фазу промывают 2,5%-ным рассолом (1880 мл). Гептан (3760 мл) добавляют к органическому слою в течение 0,5 ч, чтобы выделить осадок. Смесь охлаждают до 0°C и перемешивают 1 ч. Твердое вещество отфильтровывают вакуумным фильтрованием и промывают гептаном (1880 мл), затем сушат в вакууме при 40°C в течение ночи. Выход=551 г (87%). Чистота по данным ВЭЖХ 98,5%. Чистота по данным ^1H ЯМР >97%.

(ix) N-(3-Амино-5-трет-бутил-2-метоксифенил)метансульфонамид.

В аппарат гидрирования объемом 5 л загружают продукт со стадии (viii) (209,4 г, 0,693 моль), метанол (1675 мл, 8 объемов) и 10% Pd/C (10,2 г). Аппарат продувают $3\times\text{N}_2$ и $3\times\text{H}_2$ и затем перемешивают при давлении H_2 0,3447 МПа (50 фунт/кв.дюйм) до тех пор, пока больше не будет наблюдаться экзотерма, причем данные ВЭЖХ указывают 96,35% продукта и 1,10% исходного материала. Реакционную смесь разбавляют ТГФ (314 мл) и катализатор удаляют посредством вакуумного фильтрования (фильтр Cuno), затем промывают ТГФ (1000 мл). Растворители концентрируют, выделяют светло-коричневое твердое вещество, которое сушат в вакууме при 40°C в течение ночи. Выход=167,0 г (88,5%). Чистота по данным ВЭЖХ 96,7%. Чистота по данным ^1H ЯМР >95%.

(x) Фенил-N-[5-трет-бутил-3-(метансульфонамидо)-2-метоксифенил]карбамат.

В атмосфере N_2 загружают продукт со стадии (ix) (167,0 г, 613 ммоль), NaHCO_3 (77,3 г, 920 ммоль), ТГФ (870 мл) и ДХМ (1440 мл). По каплям добавляют фенилхлорформиат (82,6 мл, 659 ммоль), при этом температуру поддерживают ниже 20°C, и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре 4 ч. Данные ВЭЖХ реакционной смеси указывают на 98,6% продукта и 0,03% исходного материала. Реакционную смесь фильтруют и осадок на фильтре промывают ТГФ (~50 мл). Фильтрат концентрируют до ~900 мл и добавляют циклогексан (2400 мл), затем смесь перемешивают в течение ночи. Полученное твердое вещество отфильтровывают посредством вакуумного фильтрования и промывают циклогексаном (500 мл). Полученное светло-розовое твердое вещество сушат в вакууме при 40°C в течение 4 ч. Выход=232,6 г (96,7%). По данным ВЭЖХ чистота 94,5%. Чистота по данным ^1H ЯМР >95%.

(xi) 3-((4-((4-(3-(5-трет-Бутил)-2-метокси-3-(метилсульфонамидо)фенил)уреидо)нафталин-1-ил)окси)пиримидин-2-ил)амино)-5-этинил-N-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этил)бензамид.

В атмосфере N_2 загружают продукт стадии (vi) (175,5 г, 0,324 моль), продукт стадии (x) (145,0 г, 0,369 ммоль) и iPrOAc (8800 мл). Полученный раствор нагревают до 60°C и в одну порцию загружают NEt_3 (9,3 мл), затем смесь перемешивают при 60°C в течение ночи, после чего данные ВЭЖХ указывают на 25,77% продукта стадии (vi), 3,60% продукта стадии (X) и 57,85% продукта стадии (xi). Загружают дополнительное количество продукта стадии (x) (36,0 г, 0,092 моль), затем реакционную смесь перемешивают при 60°C в течение ночи, после чего данные ВЭЖХ указывают на 5,47% продукта стадии (vi), 3,72% продукта стадии (x) и 73,33% продукта стадии (xi). Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, затем концентрируют, выделяют темно-фиолетовое твердое вещество (522,9 г). Это твердое вещество перекристаллизовывают из ацетонитрила (2615 мл, 5 объемов), затем отфильтровывают посредством вакуумного фильтрования и промывают iPrOAc (2×500 мл). Полученное розовое твердое вещество сушат в вакууме при 40°C в течение ночи, получают 181,1 г (66,5%) названного соединения с чистотой (данные ВЭЖХ) 99,27%. Данные спектров ^1H ЯМР подтверждают структуру.

Биологические испытания: экспериментальные методы

Оценка связывания фермента (Kinomescan)

Активность связывания с ферментом киназ соединений, раскрытых в изобретении, может быть определена с использованием запатентованного метода оценки, который измеряет направленное на активный сайт конкурентное связывание с иммобилизованным лигандом (Fabian, M.A. et al., Nature Biotechnol., 2005, 23:329-336). Такие оценки могут быть проведены с помощью DiscoverX (раньше Ambit; San Diego, CA). Процент ингибирования, достигнутый за счет инкубации с испытуемым соединением, может быть рассчитан относительно неингибированного контроля.

Оценка ингибирования фермента

Фермент-ингибирующую активность соединений, раскрытых в изобретении, определяют с помощью резонансного переноса энергии флуоресценции (РПЭФ (FRET)) с использованием синтетических пептидов, меченых как донором, так и акцептором флуорофоров (Z-LYTE, Invitrogen Ltd., Paisley, UK).

Ингибирование фермента p38 MAPK α .

Для определения ингибирования p38 MAPK α могут быть использованы следующие две разновидности метода оценки.

Метод 1.

Ингибирующую активность испытуемых соединений в отношении изоформы p38 MAPK α (MAPK14: Invitrogen) оценивают опосредованно путем определения уровня активации/ фосфорилирования нисходящей молекулы MAPKAP-K2. Белок p38 MAPK α (80 нг/мл, 2,5 мкл) смешивают с испытуемым соединением (2,5 мкл из раствора или 4 мкг/мл, 0,4 мкг/мл, 0,04 мкг/мл или 0,004 мкг/мл) в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем добавляют раствор смеси (2,5 мкл) p38 α неактивной мишени MAPKAP-K2 (Invitrogen, 600 нг/мл) и пептида РПЭФ (8 мкМ; мишень фосфорилирования для MAPKAP-K2), и затем реакцию киназы инициируют путем добавления АТФ (АТР) (40 мкМ, 2,5 мкл). Смесь инкубируют 1 час при комнатной температуре. Проявляющий реагент (протеаза, 5 мкл) добавляют за 1 ч до детектирования в флуоресцентном считывающем устройстве для микропланшета (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific).

Метод 2.

Этот метод повторяет те же стадии, что и в описанном выше методе 1, но использует более высокую концентрацию белка p38 MAPK α (2,5 мкл из 200 нг/мл белка вместо 2,5 мкл из 80 нг/мл белка) для смешения с испытуемым соединением (испытываемом или при 1 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,01 мг/мл или 0,001 мг/мл).

Ингибирование фермента p38 MAPK γ .

Ингибирующую активность соединений изобретения относительно p38MAPK γ (MAPK12: Invitrogen) оценивают способом, аналогичным описанному выше. Фермент (800 нг/мл, 2,5 мкл) инкубируют с испытуемым соединением (2,5 мкл из или 4 мкг/мл, 0,4 мкг/мл, 0,04 мкг/мл или 0,004 мкг/мл) в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем добавляют пептиды РПЭФ (8 мкМ, 2,5 мкл) и соответствующий раствор АТФ (2,5 мкл, 400 мкМ) к смесям ферменты/соединение и все инкубируют 1 ч. Проявляющий реагент (протеаза, 5 мкл) добавляют за 1 час до детектирования в флуоресцентном считывающем устройстве для микропланшета (Varioskan® Flash, Thermo Scientific).

Ингибирование фермента c-Src и Syk.

Ингибирующую активность соединений изобретения относительно ферментов c-Src и Syk (Invitrogen) оценивают способом, аналогичным описанному выше. Соответствующий фермент (3000 нг/мл или 2000 нг/мл соответственно, 2,5 мкл) инкубируют с испытуемым соединением (или 1 мкг/мл, 0,1 мкг/мл, 0,01 мкг/мл или 0,001 мкг/мл, 2,5 мкл каждого) в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем добавляют пептиды РПЭФ (8 мкМ, 2,5 мкл) и соответствующие растворы АТФ (2,5 мкл, 800 мкМ в случае c-Src и 60 мкМ АТФ в случае Syk) к смесям ферменты/соединение и смесь инкубируют 1 ч. Проявляющий реагент (протеаза, 5 мкл) добавляют за 1 час до детектирования в флуоресцентном считывающем устройстве для микропланшета (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific).

Ингибирование фермента GSK 3 α .

Для определения ингибирования GSK 3 α могут быть использованы два следующих варианта метода оценки.

Метод 1.

Ингибирующую активность соединений изобретения относительно изоформы фермента GSK 3 α (Invitrogen) оценивают путем определения уровня активации/фосфорилирования пептида-мишени. Белок GSK3- α (500 нг/мл, 2,5 мкл) смешивают с испытуемым соединением (2,5 мкл при или 4 мкг/мл, 0,4 мкг/мл, 0,04 мкг/мл, или 0,004 мкг/мл) в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем добавляют пептид РПЭФ (8 мкМ, 2,5 мкл), который фосфорилирует мишень для GSK3 α , и АТФ (40 мкМ, 2,5 мкл) к смеси фермент/соединение и полученную смесь инкубируют 1 ч. Проявляющий реагент (протеаза, 5 мкл) добавляют в течение 1 ч перед детектированием в флуоресцентном считывающем устройстве для микропланшета (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific).

Во всех случаях сайт-специфическая протеаза расщепляет только нефосфорилированный пепид и

устраняет сигнал РПЭФ. Уровни фосфорилирования каждой реакции рассчитывают, используя соотношение эмиссии кумарина (донор) по сравнению с эмиссией флуоресцеина (акцептор), для которого высокие соотношения указывают на высокие уровни фосфорилирования, а низкие соотношения указывают на низкие уровни фосфорилирования. Процент ингибирования каждой реакции рассчитывают относительно неингибированного контроля и концентрацию 50%-ного ингибирования (значение IC_{50}) затем рассчитывают из кривой концентрация-отклик.

Метод 2.

Этот метод повторяет те же стадии, что и описанный выше метод 1, но используют более короткий период смешения испытуемого соединения (105 мин вместо 2 ч) с белком GSK3- α . Кроме того, используют концентрации испытуемого соединения или 10 мкг/мл, 1 мкг/мл, 0,1 мкг/мл или 0,01 мкг/мл.

Клеточный анализ

Соединения изобретения изучены с использованием одного или нескольких из приведенных ниже методов оценки.

(а) Ингибирование p38 MAPK α и Lck в клетках Jurkat.

Перед проведением опыта Т-клетки Jurkat выращивают в обедненной среде (RPMI 1640+5% ФБС) в течение 24 ч. Клетки собирают и ресуспендируют при концентрации 10×10^6 клеток/мл в обедненной среде и затем высевает в круглодонных 96-луночных планшетах при концентрации 1×10^6 клеток/луночка. Последовательные разведения испытуемого соединения (конечная концентрация ДМСО 1%) добавляют за 2 часа перед стимуляцией. После предварительной инкубации с испытуемым соединением клетки стимулируют с помощью H_2O_2 (0,05%, конечная концентрация) в течение 5 мин. Реакцию останавливают центрифугированием при 2000 об/мин (3 мин, 4°C), затем удаляют надосадочную жидкость и добавляют 100 мкл холодного раствора fix/perm (BD Fix/Perm набор #554714). Планшеты инкубируют 20 минут при 4°C, затем центрифугируют и промывают дополненной 1 \times средой для отмывки клеток (BD Fix/Perm набор #554714). Клетки окрашивают или для фосфо-p38 α (T180/182), поставляемого Cell Signalling Technology (9211s), или для фосфо-Lck (Y394), поставляемого R&D (MAB7500). Антитела разбавляют до 5 мкг/мл (R&D) или 1:200 (Cell Signalling Technology) в среде для отмывки клеток, затем инкубируют 1 час при 4°C в темноте. После 3 повторных промывок охлажденным льдом промывочным буфером добавляют вторичное антитело (анти-кроличье FITC-меченое #F1362 или анти-мышинное FITC-меченое #F2883, оба от Sigma) при разбавлении 1:1000 и инкубируют 1 ч при 4°C в темноте. Клетки промывают 3 раза в холодном промывочном буфере, затем следует конечная промывка в холодном ФБС, ресуспендируют в 150 мкл холодного ФБС. Клетки анализируют проточной цитометрией с использованием BD Accuri C6.

(aa) ЛПС-индуцированное высвобождение TNF α /IL-8 в клетках d-U937.

Клетки U937, человеческая моноцитарная клеточная линия, дифференцируют до клеток макрофагального типа путем инкубации с форболмиристацетатом (ФМА (PMA); 100 нг/мл) в течение от 48 до 72 ч. Клетки предварительно инкубируют с конечными концентрациями испытуемого соединения в течение 2 ч и затем стимулируют с помощью 0,1 мкг/мл ЛПС (из E. Coli: 0111:B4, Sigma) в течение 4 ч. Собирают надосадочную жидкость для определения концентраций TNF α и IL-8 с помощью ELISA сэндвич-типа (Duo-set, R&D systems). Ингибирование продуцирования TNF α рассчитывают в виде процента от продуцирования, достигаемого с помощью 10 мкг/мл BIRB796, при каждой концентрации испытуемого соединения при сравнении относительно контроля растворителем. Относительную 50%-ную эффективную концентрацию (REC_{50}) определяют из полученной кривой концентрация-отклик. Ингибирование продуцирования IL-8 рассчитывают при каждой концентрации испытуемого соединения при сравнении с контролем растворителем. Определяют 50%-ную ингибирующую концентрацию (IC_{50}) из полученной кривой концентрация-отклик.

(b) ЛПС-индуцированное высвобождение TNF α /IL-8 в клетках МКПК (PBMC).

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК (PBMC)) из здоровых субъектов отделяют от цельной крови с использованием градиента плотностей (Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare). МКПК высевает в 96-луночных планшетах и обрабатывают соединениями при желаемой концентрации в течение двух часов перед добавлением 1 нг/мл ЛПС (LPS) (Escherichia Coli 0111:B4 от Sigma Aldrich) на 24 ч при нормальных условиях культивирования ткани (37°C, 5% CO_2). Надосадочную жидкость собирают для определения концентраций IL-8 и TNF α с помощью ELISA сэндвич-типа (Duo-set, R&D systems) и считывают на флуоресцентном считывающем устройстве для микропланшета (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific). Концентрацию при 50%-ном ингибировании (IC_{50}) продуцирования IL-8 и TNF α рассчитывают из кривой доза-отклик.

(c) Высвобождение IL-2 и IFN-гамма в CD3/CD28-стимулированных клетках МКПК.

МКПК из здоровых субъектов отделяют от цельной крови с использованием градиента плотностей (Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare). Клетки добавляют в 96-луночный планшет, предварительно покрытый смесью моноклональных антител CD3/CD28 (0,3 мкг/мл eBioscience и 3 мкг/мл BD Pharmingen, соответственно). Затем соединение в желаемой концентрации добавляют в лунки и планшет оставляют на 3 дня при нормальных условиях культивирования тканей. Надосадочные жидкости собирают и высвобождают IL-2 и IFN-гамма определяют с помощью ELISA сэндвич-типа (Duo-set, R&D System). Значение

IC₅₀ определяют из кривой доза-отклик.

(d) IL-1 β -индуцированное высвобождение IL-8 в клетках HT29.

Клетки HT29, клеточная линия аденокарциномы толстой кишки человека, помещают в 96-луночный планшет (24 ч) и предварительно обрабатывают соединениями при желаемой концентрации в течение 2 ч перед добавлением 5 нг/мл IL-1 β (Abeam) на 24 ч. Надосадочные жидкости собирают для количественной оценки IL-8 с помощью ELISA сэндвич-типа (Duo-set, R&D System). Значение IC₅₀ определяют из кривой доза-отклик.

(e) ЛПС-индуцированное высвобождение IL-8 и TNF α в главных макрофагах.

МКПК из здоровых субъектов отделяют от цельной крови с использованием градиента плотностей (Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare). Клетки инкубируют в течение 2 ч и неадгезивные клетки удаляют промывкой. Для дифференциации клеток к макрофагам клетки инкубируют с 5 нг/мл ГМКФСФ (GM-CSF) (Peprotech) в течение 7 дней при нормальных условиях культивирования тканей. Затем к клеткам добавляют соединения при желаемой концентрации для 2-часовой предварительной обработки перед стимуляцией с помощью 10 нг/мл ЛПС (LPS) в течение 24 ч. Надосадочные жидкости собирают и определяют высвобождение IL-8 и TNF α с помощью ELISA сэндвич-типа (Duo-set, R&D System). Значение IC₅₀ определяют из кривой доза-отклик.

(f) Poly I:C-индуцированная экспрессия ICAM-1 в клетках BEAS2B.

Poly I:C используют в этом исследовании в качестве простого миметика РНК вируса. Смесь (Poly I:C)/олигофектамин (1 мкг/мл Poly I:C \pm 2% олигофектамина, 25 мкл; Invivogen Ltd., San Diego, CA, и Invitrogen, Carlsbad, CA, соответственно) трансфецируют в клетки BEAS2B (клетки бронхиального эпителия человека, ATCC). Клетки предварительно инкубируют при конечных концентрациях испытуемого соединения в течение 2 ч и уровень экспрессии ICAM-1 на поверхности клеток определяют с помощью ELISA на клеточной основе. При временной точке 18 ч после трансфекции poly I:C клетки фиксируют 4%-ным формальдегидом в ФСБ и затем эндогенную пероксидазу гасят путем добавления промывочного буфера (100 мкл, 0,05% Tween в ФСБ: ФСБ-Tween), содержащего 0,1% азида натрия и 1% пероксида водорода. Клетки отмывают промывочным буфером (3 \times 200 мкл) и после блокировки лунок с помощью 5% молока в ФСБ-Tween (100 мкл) в течение 1 ч, клетки инкубируют с анти-человеческим ICAM-1 антителом (50 мкл; Cell Signalling Technology, Danvers, MA) в 1% БСА ФСБ в течение ночи при 4°C.

Клетки промывают с помощью ФСБ-Tween (3 \times 200 мкл) и инкубируют со вторичным антителом (100 мкл; HRP-конъюгированное анти-кроличье IgG, Dako Ltd., Glostrup, Denmark). Затем клетки инкубируют с субстратом (50 мкл) в течение 2-20 мин, после чего добавляют стоп-реагент (50 мкл, 1н. H₂SO₄). Сигнал ICAM-1 обнаруживают путем считывания поглощения при 450 нм относительно опорной длины волны 655 нм с использованием спектрофотометра. Затем клетки промывают ФСБ-Tween (3 \times 200 мкл) и суммарное число клеток в каждой лунке определяют путем считывания поглощения при 595 нм после окрашивания кристаллическим фиолетовым (50 мкл 2%-ного раствора в ФСБ) и элюирования 1%-ным раствором ДСН (SDS) (100 мкл) в дистиллированной воде. Измеренные показания ОП (OD) 450-655 корректируют по числу клеток путем деления на показание ОП595 в каждой лунке. Ингибирование экспрессии ICAM-1 рассчитывают при каждой концентрации испытуемого соединения при сравнении с контролем растворителем. Значение 50%-ной ингибирующей концентрации (IC₅₀) определяют из полученной кривой концентрация-отклик.

(g) Оценка митоза клеток.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК (PBMC)) из здорового субъекта отделяют от цельной крови (Quintiles, London, UK) с использованием градиента плотности (Histopaque®-1077, Sigma-Aldrich, Poole, UK). МКПК (3 миллиона клеток на образец) последовательно обрабатывают 2% ФГА (РНА) (фитогемагглютинин, Sigma-Aldrich, Poole, UK) в течение 48 ч, затем 20-ти часовым воздействием переменных концентраций испытуемых соединений. За 2 ч до сбора МКПК обрабатывают демеклозином (0,1 мкг/мл; Invitrogen, Paisley, UK), чтобы остановить клетки в метафазе. Для наблюдения митоза клеток МКПК пермеабилзируют и фиксируют путем добавления Intraprep (50 мкл; Beckman Coulter, France), и окрашивают с помощью анти-фосфо-гистона 3 (0,26 нг/л; #9701; Cell Signalling, Danvers, MA) и пропидиум иодида (1 мг/мл; Sigma-Aldrich, Poole, UK), как ранее описано в публикации Muehlbauer P.A. и Schuler M.J., Mutation Research, 2003, 537:117-130. Флуоресценцию оценивают с использованием проточного цитометра ATTUNE (Invitrogen, Paisley, UK) с селекцией лимфоцитов. Процент ингибирования митоза рассчитывают для каждой обработки относительно обработки растворителем (0,5% ДМСО).

(h) Индуцированные риновирусом высвобождение IL-8 и экспрессия ICAM-1.

Риновирус человека RV16 получают из Американской коллекции типовых культур (the American Type Culture Collection, Manassas, VA). Исходные растворы вируса получают путем инфицирования клеток HeLa с помощью ЧРВ (HRV) до тех пор, пока 80% клеток не будут цитопатическими.

Клетки BEAS2B инфицируют ЧРВ при множественности заражения (МЗ (MOI)) 5 и инкубируют 2 часа при 33°C с мягким встряхиванием для стимуляции поглощения. Затем клетки промывают ФСБ, добавляют свежую среду и клетки инкубируют еще 72 ч. Надосадочную жидкость собирают для оценки кон-

центраций IL-8 с использованием набора для проявления DuoSet ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN).

Уровень ICAM-1-экспрессирующей клеточной поверхности определяют с помощью ELISA на клеточной основе. Через 72 ч после инфицирования клетки фиксируют с помощью 4%-ного формальдегида в ФСБ. После гашения эндогенной пероксидазы путем добавления 0,1% азида натрия и 1% пероксида водорода, лунки отмывают промывочным буфером (0,05% Tween в ФСБ: ФСБ-Tween). После блокировки лунки 5% молоком в ФСБ-Tween в течение 1 ч клетки инкубируют с анти-человеческим ICAM-1 антителом в 5% БСА ФСБ-Tween (1:500) в течение ночи. Лунки промывают ФСБ-Tween и инкубируют со вторичным антителом (HRP-конъюгированное антикроличье IgG, Dako Ltd.). Сигнал ICAM-1 обнаруживают путем добавления субстрата и считывания поглощения при 450 нм с опорной длиной волны 655 нм с использованием спектрофотометра. Затем клетки промывают ФСБ-Tween и суммарное число клеток в каждой лунке определяют путем считывания поглощения при 595 нм после окрашивания кристаллическим фиолетовым (50 мкл 2%-ного раствора в ФСБ) и элюирования 1%-ным раствором ДСН (SDS). Измеренные показания ОП₄₅₀₋₆₅₅ корректируют по числу клеток путем деления на показание ОП₅₉₅ в каждой лунке. Соединения добавляют за 2 ч до инфицирования ЧРВ и через 2 ч после инфицирования, когда неинфицированные ЧРВ клетки отмывают.

(i) Оценка HRV16-индуцированного цитопатического эффекта (ЦПЭ (CPE)) в клетках MRC5.

Клетки MRC5 инфицируют HRV16 при МЗ 1 в среде DMEM, содержащей 5% ФТС (FCS) и 1,5 мМ MgCl₂, после чего инкубируют 1 час при 33°C, чтобы стимулировать поглощение. Надосадочные жидкости отсасывают, затем добавляют свежую среду, после чего инкубируют 4 дня. При необходимости клетки предварительно инкубируют с соединением или с ДМСО в течение 2 ч, и соединения и ДМСО добавляют снова после отмывания вируса.

Надосадочные жидкости отсасывают и инкубируют с раствором метиленового синего (100 мкл, 2% формальдегида, 10% метанола и 0,175% метиленового синего) в течение 2 ч при комнатной температуре. После промывки в каждую лунку добавляют 1% ДСН в дистиллированной воде (100 мкл) и планшеты легко встряхивают 1-2 ч перед считыванием поглощения при 660 нм. Рассчитывают процент ингибирования для каждой лунки. Значения IC₅₀ рассчитывают из кривой концентрация-отклик, полученной за счет последовательных разбавлений испытуемых соединений.

(j) In vitro вирусная нагрузка РСВ в первичных клетках бронхиального эндотелия.

Нормальные клетки бронхиального эндотелия человека (NHBE), выращенные в 96-луночных планшетах, инфицируют RSV A2 (Штамм A2, НРА, Salisbury, UK) при МЗ 0,001 в смеси (среда LHC8):RPMI-1640 (50:50), содержащей 15 мМ хлорида магния, и инкубируют 1 час при 37°C для поглощения. Клетки промывают ФСБ (3×200 мкл), затем добавляют свежую среду (200 мкл) и инкубацию продолжают 4 дня. При необходимости клетки предварительно инкубируют с соединением или с ДМСО в течение 2 ч и затем добавляют снова после отмывки вируса.

Клетки фиксируют с помощью 4%-ного формальдегида в растворе ФСБ (50 мкл) в течение 20 мин, промывают ПБ (WB) (3×200 мкл) (промывочный буфер, ФСБ, содержащий 0,5% БСА и 0,05% Tween-20) и инкубируют с раствором для блокировки (5% концентрированное молоко в ФСБ) 1 ч. Клетки затем промывают ПБ (3×200 мкл) и инкубируют 1 ч при комнатной температуре с анти-RSV (2F7) антителом к F-гибридному белку (40 мкл; мышинное моноклональное, партия 798760, Cat. No.ab43812, Abcam) в 5% БСА в ФСБ-Tween. После промывки клетки инкубируют с раствором HRP-конъюгированного вторичного антитела (50 мкл) в 5% БСА в ФСБ-Tween (партия 00053170, Cat.No. P0447, Dako) и затем добавляют ТМБ (ТМБ) субстрат (50 мкл; упаковка субстратного реагента, партия 269472, Cat. No. DY999, R&D Systems, Inc.). Эту реакцию останавливают добавлением 2н. H₂SO₄ (50 мкл) и полученный сигнал определяют калориметрически (ОП: 450 нм с опорной длиной волны 655 нм) в считывающем устройстве для микропланшета (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific).

Затем клетки промывают и применяют 2,5% раствор кристаллического фиолетового (50 мкл; партия 8656, Cat. No. PL7000, Pro-Lab Diagnostics) в течение 30 мин. После промывки с помощью ПБ, в каждую лунку добавляют 1% раствор ДСН в дистиллированной воде (100 мкл), и планшеты легко встряхивают в течение 1 ч перед считыванием поглощения при 595 нм. Измеренные показания ОП₄₅₀₋₆₅₅ корректируют к числу клеток путем деления значений ОП₄₅₀₋₆₅₅ на значения ОП₅₉₅. Рассчитывают процент ингибирования для каждой лунки и значение IC₅₀ рассчитывают из кривой концентрация-отклик, полученной из последовательных разбавлений соединения.

(k) Анализ жизнеспособности клеток: МТТ-тест.

Дифференцированные клетки U937 предварительно инкубируют с каждым испытуемым соединением (конечная концентрация 1 мкг/мл или 10 мкг/мл в 200 мкл среды, представленной ниже) по двум протоколам: первый - 4 ч в 5% ФТС среда RPMI1640, и второй - в 10% ФТС среда RPMI1640 в течение 24 ч. Надосадочную жидкость заменяют новой средой (200 мкл) и в каждую лунку добавляют исходный раствор МТТ (10 мкл, 5 мг/мл). После инкубации в течение 1 ч среду удаляют, в каждую лунку добавляют ДМСО (200 мкл) и планшеты легко встряхивают в течение 1 ч перед считыванием поглощения при 550 нм. Процент потери жизнеспособности клеток рассчитывают для каждой лунки относительно обработки растворителем (0,5% ДМСО). Таким образом, наблюдаемое повышение жизнеспособности клеток

в случае обработки лекарством относительно растворителя приведено в таблице в виде отрицательного процента.

(l) Анализ биопсии человека.

Биопсию слизистой оболочки кишечника получают из воспаленных областей толстой кишки у больных ВЗК (IBD). Материал биопсии разрезают на мелкие кусочки (2-3 мм) и помещают на стальные решетки в камере для культуры органов при 37°C в атмосфере 5% CO₂/95% O₂ в бессывороточной среде. К ткани добавляют ДМСО-контроль или испытуемые соединения при целевых концентрациях и инкубируют 24 ч в камере для культуры органов. Собирают надосадочную жидкость для определения уровней IL-6, IL-8, IL-1β и TNFα с помощью R&D ELISA. Процент ингибирования высвобождения цитокина испытуемыми соединениями рассчитывают относительно высвобождения цитокина, определенного для ДМСО-контроля (100%).

(m) Накопление β-катенина в клетках d-U937.

Клетки U937, человеческая моноцитарная клеточная линия, дифференцируют в клетки макрофагального типа путем инкубации с ФМА (PMA) (100 нг/мл) в течение от 48 до 72 ч. Затем клетки инкубируют или с конечными концентрациями испытуемого соединения или с растворителем в течение 18 ч. Индукцию β-катенина испытуемыми соединениями останавливают путем замены среды 4%-ным раствором формальдегида. Активность эндогенной пероксидазы нейтрализуют путем инкубации с гасящим буфером (100 мкл, 0,1% азида натрия, 1% H₂O₂ в ФСБ с 0,05% Tween-20) в течение 20 мин. Клетки промывают промывочным буфером (200 мкл; ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20) и инкубируют с блокирующим раствором (200 мкл; 5% молока в ФСБ) в течение 1 ч, повторно промывают промывочным буфером (200 мкл) и затем инкубируют в течение ночи с раствором анти-β-катенин антитела (50 мкл) в 1% БСА/ФСБ (BD, Oxford, UK).

После промывки промывочным буфером (3×200 мкл; ФСБ, содержащий 0,05% Tween-20) клетки инкубируют с раствором HRP-конъюгированного вторичного антитела (100 мкл) в 1% БСА/ФСБ (Dako, Cambridge, UK) и получаемый сигнал определяют калориметрически (ОП: 450 нм с опорной длиной волны 655 нм) с использованием ТМБ субстрата (50 мкл; R&D Systems, Abingdon, UK). Эту реакцию останавливают добавлением 1н. раствора H₂SO₄ (50 мкл). Затем клетки промывают промывочным буфером и применяют в течение 30 мин 2%-ный раствор кристаллического фиолетового (50 мкл). После промывки промывочным буфером (3×200 мкл) в каждую лунку добавляют 1% раствор ДСН (100 мкл) и планшеты легко встряхивают в течение 1 часа перед измерением поглощения при 595 нм (Varioskan® Flash, Thermo-Fisher Scientific).

Измеренные показания ОП₄₅₀₋₆₅₅ корректируют по числу клеток путем деления значений ОП₄₅₀₋₆₅₅ на значения ОП₅₉₅. Процент индукции для каждой лунки рассчитывают относительно растворителя, и отношение индукции нормализуют при сравнении с индукцией, произведенной с помощью стандартного контроля, содержащего справочное соединение N-(4-(4-(3-(3-трет-бутил-1-п-толил-1Н-пиразол-5-ил)уреидо)нафталин-1-илокси)пиримидин-2-ил)-2-метокси-ацетат (1 мкг/мл), которую принимают в качестве единицы.

(n) Пролиферация Т-клеток.

МКПК из здоровых субъектов отделяют от цельной крови с использованием градиента плотности (Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare). Фракцию лимфоцитов вначале обогащают CD4⁺ Т-клетками путем магнитной сортировки клеток согласно инструкциям производителя (Miltenyi Biotec 130-091-155). Необученные CD4⁺ Т-клетки затем отделяют с применением позитивного магнитного отбора CD45RA⁺ клеток с использованием микробусин согласно инструкциям производителя (130-045-901). Клетки размещают из расчета 2×10⁵ клеток на лунку в 100 мкл среды RPMI/10% ФБС на 96-луночном плоскодонном планшете (Corning Costar). Разбавляют 25 мкл испытуемого соединения до соответствующей концентрации (8× конечная концентрация) в нормальной среде и добавляют в дублирующие лунки на планшете, чтобы получить интервал доза-ответ от 0,03 до 250 нг/мл. Добавляют ДМСО в качестве негативного контроля. Планшеты предварительно инкубируют в течение 2 ч перед стимуляцией с помощью 1 мкг/мл анти-CD3 (ОКТ3; eBioscience). Через 72 ч среду в каждой лунке заменяют 150 мкл свежей среды, содержащей 10 мкМ БДУ (BrdU) (Roche). Через 16 ч надосадочную жидкость удаляют, планшеты сушат и клетки фиксируют путем добавления в каждую клетку 100 мкл фиксирующего/денатурирующего раствора в течение 20 мин согласно инструкциям производителя (Roche). Планшеты промывают один раз с помощью ФСБ перед добавлением анти-BrdU детекторного антитела и инкубируют 90 мин при комнатной температуре. Планшеты затем осторожно промывают 3 раза промывочным буфером, поддерживают и проявляют добавлением 100 мкл раствора субстрата. Реакцию останавливают добавлением 50 мкл 1М раствора H₂SO₄ и считывают поглощение при 450 нм на считывающем устройстве для планшетов (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific). Значение IC₅₀ определяют из кривой доза-отклик.

(o) Высвобождение IL-2 и IFNγ в CD3/CD28-стимулированных клетках МКСП от больных ВЗК.

Мононуклеарные клетки собственной пластинки (МКСП (LPMC)) выделяют и очищают из воспаленной слизистой оболочки хирургических препаратов ВЗК или из нормальной слизистой оболочки хирургических препаратов следующим образом.

Слизистую оболочку удаляют из более глубоких слоев хирургических препаратов с помощью скальпеля и разрезают на фрагменты размерами 3-4 мм. Эпителий удаляют промывкой тканевых фрагментов три раза с помощью 1 мМ ЭДТУК (EDTA) (Sigma-Aldrich, Poole, UK) в HBSS (Sigma-Aldrich) при перемешивании с использованием магнитной мешалки, отбрасывая надосадочную жидкость после каждой промывки. Затем образец обрабатывают коллагеназой типа 1А (1 мг/мл; Sigma-Aldrich) в течение 1 ч с перемешиванием при 37°C. Полученную клеточную суспензию затем фильтруют с использованием 100 мкм клеточного сита, промывают дважды, ресуспендируют в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, и используют для клеточной культуры.

Свежевыделенные МКСП (2×10^5 клетки/лунка) стимулируют с помощью 1 мкг/мл α -CD3/ α -CD28 в течение 48 ч в присутствии или ДМСО-контроля или соответствующих концентраций соединения.

Через 48 ч надосадочную жидкость удаляют и оценивают на присутствие TNF α и IFN γ с помощью R&D ELISA. Процент ингибирования высвобождения цитокинов испытуемыми соединениями рассчитывают относительно высвобождения цитокинов, определенного для ДМСО-контроля (100%).

(р) Ингибирование высвобождения цитокинов из миофибробластов, выделенных из больных ВЗК.

Миофибробласты из воспаленной при ВЗК слизистой оболочки выделяют следующим образом.

Слизистую оболочку рассекают и снимают, образцы слизистой оболочки размерами 1 мм культивируют при 37°C во влажном CO₂ инкубаторе в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM, Sigma-Aldrich) с добавкой 20% ФБС, 1% неосновных аминокислот (Invitrogen, Paisley, UK), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 50 мкг/мл гентамицина и 1 мкг/мл амфотерицина (Sigma-Aldrich). Сформировавшиеся колонии миофибробластов высевают в 25-см² колбы для культур и культивируют в среде DMEM, дополненной 20% ФБС и антибиотиками, по меньшей мере, до переноса 4, чтобы обеспечить достаточное количество для использования в опытах по стимуляции.

Субконфлюэнтные монослои миофибробластов, посеянных в 12-луночных планшетах при концентрации 3×10^5 клеток на лунку, обедняют в бессывороточной среде в течение 24 ч при 37°C, 5% CO₂, перед культивированием в течение 24 ч в присутствии или ДМСО-контроля или соответствующих концентраций соединения. Через 24 ч надосадочную жидкость удаляют и оценивают на присутствие IL-8 и IL-6 с помощью R&D ELISA. Процент ингибирования высвобожденных цитокинов испытуемыми соединениями рассчитывают относительно высвобожденных цитокинов, определенных для ДМСО-контроля (100%).

(q) Дегрануляция нейтрофилов человека.

Нейтрофилы выделяют из периферической крови человека следующим образом.

Кровь собирают венопункцией и предупреждают от свертывания путем добавления смеси (1:1) ЭДТУК: (стерильный фосфатно-солевой буфер) (ФСБ, без Ca⁺/Mg⁺). Добавляют декстран (3% мас./об.) (1 часть раствора декстрана к 4 частям крови), и крови дают стоять приблизительно 20 минут при комнатной температуре. Надосадочную жидкость осторожно расслаивают по градиенту плотности (Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare) и центрифугируют (15 мин, 2000 об/мин, без торможения). Надосадочную жидкость отсасывают и клеточные пеллеты ресуспендируют в стерильном физиологическом растворе (0,2%) в течение не более чем 60 с (чтобы лизировать загрязняющие эритроциты). Затем добавляют 10-кратный объем ФСБ и клетки центрифугируют (5 мин, 1200 об/мин). Клетки ресуспендируют в HBSS+ (сбалансированный солевой раствор Хэнка (без фенолового красного), содержащий цитохалазин В (5 мкг/мл) и 1 мМ CaCl₂, до достижения концентрации 5×10^6 клеток/мл.

В каждую лунку 96-луночного планшета с V-образным дном добавляют 5×10^4 клеток и инкубируют (30 мин, 37°C) с соответствующей концентрацией испытуемого соединения (0,3-1000 нг/мл) или с растворителем (ДМСО, конечная концентрация 0,5%). Дегрануляцию стимулируют добавлением ФМЛФ (fMLP) (конечная концентрация 1 мкМ). После дополнительной инкубации (30 мин, 37°C) клетки удаляют центрифугированием (5 минут, 1500 об/мин) и надосадочную жидкость переносят в плоскодонный 96-луночный планшет. Добавляют равный объем тетраметилбензида (ТМБ (ТМВ)), через 10 мин реакцию останавливают добавлением равного объема серной кислоты (0,5 М) и считывают поглощение при 450 нм (фон при 655 нм вычитают). Значение 50%-ной ингибирующей концентрации (IC₅₀) определяют из полученной кривой концентрация-отклик.

(г) Оценка клеточной цитотоксичности.

Клетки ТК6, 5×10^4 , (линия лимфобластных Т-клеток) добавляют к соответствующему числу лунок 96-луночного планшета в 195 мкл среды (RPMI, дополненная 10% фетальной телячьей сыворотки). В лунки добавляют 5 мкл ДМСО-контроля (конечная концентрация 0,5% об./об.) или испытуемого соединения (конечная концентрация или 5 или 1 мкг/мл) и инкубируют при 37°C, 5% CO₂.

Через 24 ч планшет центрифугируют при 1300 об/мин в течение 3 мин и надосадочную жидкость отбрасывают. Затем клетки ресуспендируют в 7,5 мкг/мл пропидиум иодида (ПИ (PI)) в ФСБ. Через 15 мин клетки анализируют с помощью проточного цитометра (BD accuri). Процент жизнеспособности рассчитывают в виде % клеток, которые являются ПИ негативными в тестовых лунках, нормализованных к ДМСО-контролю.

Скрининг In Vivo: фармакодинамика и противовоспалительная активность

(i) ЛПС-индуцированное накопление нейтрофилов в мышцах.

Не голодавших мышей Balb/c дозируют путем интратрахеального способа введения или раствором, или испытуемым соединением в указанное время (в пределах интервала 2-8 ч) перед стимуляцией воспалительной реакции за счет применения провокации ЛПС. При T=0 мышей помещают в затравочную камеру и подвергают воздействию ЛПС (7,0 мл, раствор 0,5 мг/мл в ФСБ) в течение 30 мин. Еще через 8 ч животных анестезируют, их трахеи канюлируют и ЖБАЛ (BALF) извлекают путем вливания, а затем выводят из их легких 1,0 мл ФСБ через трахеальный катетер. Подсчет всех и отдельных лейкоцитов в образцах ЖБАЛ измеряют с использованием гемоцитометра Нейбауэра. Цитоспиновые клеточные мазки образцов ЖБАЛ готовят центрифугированием при 200 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре и окрашивают с использованием окрашивающей системы Дифф-Квик (DiffQuik) (Dade Behring). Клетки считают с использованием масляно-иммерсионной микроскопии. Данные по числу нейтрофилов в БАЛ (BAL) представляют в виде среднего значения \pm S.E.M. (стандартная ошибка среднего). Процент ингибирования накопления нейтрофилов рассчитывают для каждой обработки относительно обработки контролем.

(ii) Модель сигаретного дыма.

Мышей A/J (самцы, возраст 5 недель) подвергают воздействию сигаретного дыма (4%-ный сигаретный дым, разбавленный воздухом) в течение 30 мин в день в течение 11 дней с использованием экспериментальной системы вдыхания табачного дыма (Tobacco Smoke Inhalation Experiment System) для небольших животных (Model SIS-CS; Sibata Scientific Technology, Tokyo, Japan). Испытуемые вещества вводят интраназально (35 мкл раствора в 50% ДМСО/ФСБ) один раз в день в течение 3 дней после финального воздействия сигаретным дымом. Через 12 ч после последнего дозирования каждое из животных анестезируют, трахеи канюлируют и собирают жидкость бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ (BALF)). Число альвеолярных макрофагов и нейтрофилов определяют с помощью FACS анализа (EPICS® ALTRA II, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) с использованием антимышиного MOMA2 антитела (макрофаг) или антимышиного 7/4 антитела (нейтрофил).

(iii) DSS-индуцированные колиты у мышей.

Не голодавших, 10-12-недельного возраста, самцов мышей BDF1 дозируют с помощью орального желудочного зонда дважды в день или растворителем, или справочным веществом (5-ASA), или испытуемым соединением за один день до (день - 1) стимуляции воспалительной реакции путем обработки декстрансульфатом натрия (DSS). На 0 день исследования DSS (5% масс./об.) вводят в питьевой воде, затем следует дозирование дважды в день растворителем (5 мл/кг), справочным веществом (100 мг/кг) или испытуемым соединением (5 мг/кг) в течение 7 дней. Питьевую воду с DSS пополняют каждые 3 дня. Во время исследования животных взвешивают каждый день, проводят наблюдения за калом и результаты записывают в виде баллов, исходя из консистенции кала. На время умерщвления на день +6 толстый кишечник извлекают и записывают длину и массу. Участки прямой кишки отбирают для анализа миелопероксидазы (МПО (MPO)), чтобы определить нейтрофильную инфильтрацию, или для выставления баллов гистопатологии для определения тяжести заболевания.

(iv) ТНБС-индуцированный колит у мышей.

Не голодавших, 10-12-недельного возраста, самцов мышей BDF1 дозируют с помощью орального желудочного зонда дважды в день или растворителем (5 мл/кг), или справочным веществом (будесонид, 2,5 мг/кг), или испытуемым соединением (1 или 5 мг/кг) за один день до (Day - 1) стимуляции воспалительной реакции путем обработки 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (ТНБС (TNBS)) (15 мг/мл в смеси 50% этанол/50% физиологический раствор). На день 0 исследования ТНБС (200 мкл) вводят внутрь толстой кишки через пластиковый катетер с дозированием дважды в день растворителем, справочным веществом или испытуемым соединением, которое продолжается в течение 2 или 4 дней. Во время исследования животных взвешивают каждый день, проводят наблюдения за калом и результаты записывают в виде баллов, исходя из консистенции кала. На время умерщвления толстый кишечник извлекают и записывают длину и массу. Участки прямой кишки отбирают для выставления баллов гистопатологии, чтобы определить тяжесть заболевания.

(v) Адоптивный перенос у мышей.

На день исследования 0 самок мышей Balb/C умерщвляют и получают селезенки для выделения клеток CD45RB^{high} (с использованием протокола разделения клеток SCIN IBD (ТКИН ВЗК)). Затем приблизительно 4×10^5 клеток/мл клеток CD45RB^{high} впрыскивают интраперитонеально (100 мкл/мышь) в самок животных с ТКИН. На 14 день мышей взвешивают и случайным образом распределяют на обрабатываемые группы на основе массы тела. На 14 день соединения вводят дважды в день через оральный желудочный зонд в растворителе, арахисовом масле, при уровнях доз, приведенных ниже в таблицах 6a и 6b, и при объеме дозы 5 мл/кг. Обработку продолжают до 42 дня исследования, и на этом этапе животных вскрывают через 4 часа после утреннего введения. Записывают длину и массу толстой кишки и используют как вторичную конечную точку исследования в качестве критерия эдемы толстой кишки. Толстую кишку затем делят на шесть поперечных срезов, четыре из которых используют для бальной оцен-

ки гистопатологии (основная конечная точка) и два гомогенизируют для проведения оценки цитокинов. Показанные результаты представляют собой % ингибирования окна индукции между не использовавшимися в опытах животными и животными, обрабатываемыми растворителем, где более высокое ингибирование означает приближение к не болюющему, не подвергавшемуся обработке фенотипу.

(vi) Индуцированный эндотоксином увеит у крыс Самцов крыс Lewis (возраст 6-8 недель, Charles River UK Limited) содержат в клетках по 3 при 19-21°C с 12-ти часовым циклом свет/темнота (07:00/19:00), кормят стандартной пищей для грызунов и дают воду без ограничения. Не голодавших крыс взвешивают, по отдельности идентифицируют на хвосте с помощью несмываемого маркера и проводят однократное интравитреальное введение в правое стекловидное тело (объем дозы 5 мкл) из расчета 100 нг/животное ЛПС (*Escherichia coli* 0111:B4, приготовленный в ФСБ, Sigma Aldrich, UK) с использованием иглы калибра 32. Необработанным крысам впрыскивают ФСБ. Испытуемое соединение, дексаметазон (Dex) или носитель (20% гидроксипропил-β-циклодекстрина, 0,1% ГПМЦ (HPMC), 0,01% бензалконийхлорида, 0,05% ЭДТУК, 0,7% NaCl в деионизированной воде) вводят локально на правый глаз (10 мкл) животного за 30 мин до введения ЛПС, во время введения ЛПС и через 1, 2 и 4 ч после введения ЛПС. Перед введением раствор или суспензию, которые должны быть введены, перемешивают 5 минут, чтобы гарантировать однородность суспензии. Через 6 часов после введения дозы ЛПС животных подвергают эвтаназии с помощью сверхдозы пентабарбитона (в/в.). После эвтаназии правый глаз каждого животного вытаскивают и рассекают на фронтальный (передний) и тыльный (задний) участки вокруг линз. Каждый участок взвешивают и гомогенизируют в 500 мкл стерильного фосфатно-солевого буфера после чего центрифугируют 20 мин при 12000 об/мин при 4°C. Полученную надосадочную жидкость делят на 3 аликвоты и хранят при -80°C до последующего анализа цитокинов с помощью R&D DuoSet ELISA.

Обобщение результатов скрининга In Vitro и In Vivo

Таблица 1a. Константа диссоциации для выбранных киназ, определенная с помощью LeadHunter Discover Services (DiscoverX Corporation, Fremont, CA) с использованием технологии KINOMEScan™

Испытуемый препарат	Константа диссоциации (нМ)		
	Lck	p38 MAPKα	Syk
Соединение 1	4,1	9	21

Исследования, проведенные с помощью LeadHunter Discover Services (DiscoverX Corporation, Fremont, CA) с использованием технологии KINOMEScan™, показывают, что соединение примеров (соединение I) не оказывает никакого существенного влияния на связывание киназ B-Raf и B-Raf (V600E) с их стандартными лигандами. Более того, это соединение показывает существенно улучшенную селективность по сравнению со справочным соединением N-(4-(4-(3-(3-трет-бутил-1-п-толил-1H-пиразол-5-ил)уреидо)нафталин-1-илокси)пиримидин-2-ил)-2-метоксинацетамидом (WO 2010/112936), о чем свидетельствуют более низкие показатели селективности (Табл. 1b).

Таблица 1b. Показатели селективности в соответствии с KinomeScan при 50 и 500 нМ;

S(35) = (число немутантных киназ с % от контроля <35)/(число испытанных немутантных киназ);

S(10) = (число немутантных киназ с % от контроля <10)/(число испытанных немутантных киназ);

S(1) = (число немутантных киназ с % от контроля <1)/(число испытанных немутантных киназ).

Соедин.	Показатель селективности KinomeScan/число поражений отдельных киназ					
	50 нМ			500 нМ		
	S(35)	S(10)	S(1)	S(35)	S(10)	S(1)
Справочное соединение	0,174/ 67	0,083/ 32	0,018/ 7	0,370/ 143	0,272/ 105	0,117/ 45
Соединение 1	0,068/ 27	0,023/ 9	0,000/ 0	0,197/ 78	0,129/ 51	0,038/ 15

Таблица 1c. Результаты оценки in vitro ингибирования p38 MAPKα (метод 2), c-Src, Syk и GSK3α (Method 2)

Испытуемое соединение	Значения IC ₅₀ для ингибирования фермента (нМ)			
	p38 MAPKα	c-Src	Syk	GSK3α
Соединение 1	224	24	591	411

Таблица 1d. Данные оценок фосфопотока, характеризующие ингибирование клеточных p38 MAPK α и Lck

Испытуемый препарат		Значения IC ₅₀ (нг/мл)	
		фосфо-p38 MAPK α	фосфо-Lck
Соединение 1		20	6

Таблица 2. Ингибирование высвобождения цитокинов в стимулированных клетках (описанные выше способы оценки (b), (c) и (d))

Испытуемый препарат	Значения IC ₅₀ для ингибирования высвобождения цитокинов (нМ)						
	Клетки dU937		МКПК				Клетки HT29
	IL-8	TNF α	IL-8	TNF α	IL-2	IFN γ	IL-8
Соединение 1	-	-	1,5	-	74,0	7,3	8,0

Как показано ниже в табл. 3, соединение I также проверено при оценке на клетках, например, в описанной выше модели ex-vivo биопсии человека, где оно проявило значительные противовоспалительные эффекты в биопсии от больных неспецифическим язвенным колитом (НЯК (UC)). В отличие от здоровых добровольцев биопсии слизистой оболочки кишечника от больных НЯК, как показано, спонтанно высвобождают провоспалительные цитокины in vitro (Onken J.E. et al., J Clin Immunol, 2008, 126(3): 345-352). Таким образом, соединение I значительно ингибирует высвобождение цитокинов (IL-1 β , IL-6 и IL-8) по сравнению с ДМСО-контролем при инкубации при концентрации 1 мкг/мл в течение 24 ч с биопсиями от больных неспецифическим язвенным колитом.

Таблица 3. Обобщенные результаты оценки с использованием биопсии слизистой оболочки кишечника из воспаленных областей толстой кишки различных больных, страдающих неспецифическим язвенным колитом (форма ВЗК)

Группа обработки	Высвобождение цитокинов из биопсий больных НЯК					
	n	Высвобождение IL-1 β	n	Высвобождение IL-6	n	Высвобождение IL-8
Контроль ДМСО		100%		100%		100%
Соединение 1 (1 мкг/мл)	4	5 \pm 8	4	17 \pm 23	2	9 \pm 15

Как показано ниже в табл. 4а, соединение I является значительно менее активным, чем справочное соединение (N-(4-(4-(3-(3-трет-бутил-1-п-толил-1Н-пиразол-5-ил)уреидо)нафталин-1-ил-окси)пиридин-2-ил)-2-метоксиацетамид; WO 2010/112936), при описанном выше анализе (g), в котором измеряют воздействие на деление клеток (митоз) в МКПК.

Таблица 4а. Влияние соединения I на деление клеток в МКПК в сравнении со справочным соединением

Испытуемое соединение	Ингибирование митоза, %, при 5 мкг/мл
Справочное соединение	87,8 ^a
Соединение 1	20,5

См., например, значение, указанное в публикации WO 2013/050757.

Как показано ниже в табл. 4b, соединение I не вызывает какой-либо значительной индукции β -катенина при изучении описанным выше способом оценки (m). Таким образом, потенциал этого соединения для повышения клеточных концентраций β -катенина, как установлено, является отрицательным в том, что индуктивный эффект при различных испытанных концентрациях существенно меньше, чем эффект, производимый справочным соединением при концентрации 1 мкг/мл.

Таблица 4b. Влияние соединения I на индукцию β -катенина в сравнении со справочным соединением

Испытуемое соединение	Индукция β -катенина, %		
	Концентрация испытуемого соединения		
	1 мкг/мл	5 мкг/мл	10 мкг/мл
Справочное соединение	100	НИ	НИ
Соединение I	21	14	26

НИ - не испытано.

Как показано ниже в табл. 5, соединение I также проверено в описанном выше методе оценки *in vivo* (iv), который проводят в течение 2 дней и с использованием само-микроэмульгирующейся системы доставки лекарства (SMEDDS) в качестве носителя, содержащей определенную смесь кукурузного масла (32,5%), транскутола (20%), маизина (12,5%) и кремофора (cremophor ELP) (35%). Анализ гистопатологии обнаруживает, что соединение I проявляет существенную активность в такой *in vivo* модели воспаления толстой кишки. В частности, это соединение при дозировании перорально при 5 мг/кг демонстрирует заметное улучшение в выраженности язвы и регенерации эпителия в сравнении с контролем растворителем. Кроме того, оно продуцирует заметное уменьшение инфильтрата воспалительных клеток и зон собственного слоя.

Таблица 5. Влияние соединения I на TNBS-индуцированный колит у мышей

Группа обработки	TNBS (TNBS)		
	n	Выраженность язвы	Воспаление LP
Не болеющие	6	0,0 \pm 0,0	0,2 \pm 0,2
TNBS + Носитель	24	4,4 \pm 0,4	4,8 \pm 0,4
TNBS + Соединение I	12	3,6 \pm 0,5	3,8 \pm 0,4

Как показано ниже в таблицах 6a и 6b, соединение I также проверено в описанном выше способе оценки *in vivo* (адоптивный перенос) (v). Анализ относительных соотношений массы к длине толстой кишки у необработанных, контрольных и обработанных животных в конце исследования показывает, что соединение I проявляет значительную активность в такой управляемой T-клетками *in vivo* модели воспаления толстой кишки.

Таблица 6a. Обобщенные результаты, полученные в мышинной модели адоптивного переноса

Группа обработки	Доза	Масса:длина толстой кишки	Ингибирование %
Не обработанные	Нет	0,022 \pm 0,001	100
Циклоспорин А	75 мг/кг	0,029 \pm 0,001	64
Контроль растворителем	Нет	0,042 \pm 0,005	0
Соединение I	0,3 мг/кг	0,024 \pm 0,003	90

Таблица 6b. Другие обобщенные результаты дополнительного исследования на мышинной модели адоптивного переноса

Группа обработки	n	Масса:длина толстой кишки
Не болеющие	4	0,021 \pm 0,001
Контроль растворителем	12	0,047 \pm 0,004
Соединение I (3 мг/кг)	12	0,034 \pm 0,003
Соединение I (0,3 мг/кг)	12	0,041 \pm 0,005
Соединение I (0,03 мг/кг)	12	0,033 \pm 0,002

Как показано ниже в табл. 6c, соединение I также значительно снижает уровни провоспалительных цитокинов в образцах ткани толстой кишки из мышей в модели адоптивного переноса.

Таблица 6с. Обобщенные данные измерения уровня цитокинов, полученные в мышинной модели адоптивного переноса

Не болеющие	4	1,3±0,6	7,9±0,9
Контроль растворителем	12	117,7±36,6	1064,9±239,6
Соединение I (3 мг/кг)	12	10,8±3,3	70,8±22,0

Обобщенные результаты дополнительных исследований**Определение фармакокинетических параметров**

Исследования проведены Sai Life Sciences (Hinjewadi, Pune, India) для изучения фармакокинетики в плазме и общего распределения в ткани толстой кишки соединения I. В частности, фармакокинетические исследования проведены на:

самцах мышей C57BL/6 после однократного перорального введения; и

самцах крыс Wistar после однократного внутривенного или перорального введения.

Полученные данные показывают, что соединение I создает значительные концентрации в толстой кишке, тогда как содержание в плазме является очень низким или пренебрежимо низким.

Таблица 8а. Медианные концентрации в плазме (нг/мл), полученные после перорального введения соединения I мышам при 5 мг/кг

Испытуемый препарат	Растворитель	Время (час)						
		1	2	4	6	8	12	24
Соединение I	В	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Примечание: растворитель В = (кукурузное масло:транскутол:маизин: (cremophor ELP) (32,5:20:12,5:35), само-микроэмульгирующая система доставки лекарства (SMEDDS).

Таблица 8b. Медианные суммарные концентрации в толстой кишке (мг/г), полученные после перорального введения соединения I мышам при 5 мг/кг (растворитель В тот же, что и в табл. 8а)

Испытуемый препарат	Растворитель	Время (час)						
		1	2	4	6	8	12	24
Соединение I	В	0,0	10,4	420	3080	1951	126	23

Таблица 9а. Фармакокинетические данные, полученные после внутривенного введения соединения I крысам при 0,25 мг/кг в 5% ДМСО, 7,5% Solutol HS15 и 87,5% нормального физиологического раствора

Испытуемый препарат	C ₀ (нг/мл)	AUC _{last} (час*нг/мл)	AUC _{INF} (час*нг/мл)	T _{1/2} (час)	Cl (мл/мин/кг)	V _{ss} (л/кг)
Соединение I	6536	869	871	0,1	4,8	0,03

Таблица 9b. Фармакокинетические данные, полученные после перорального введения соединения I крысам при 5 мг/кг

Испытуемый препарат	Растворитель	T _{max} (час)	C _{max} (нг/мл)	AUC _{last} (час*нг/мл)	AUC _{INF} (час*нг/мл)	F _{po} (%)
Соединение I	В	НР ^[‡]	НР ^[‡]	НР ^[‡]	НР ^[‡]	0,0

Примечание: растворитель В = как и в табл. 8а.

[‡] - не рассчитано (НР), так как в плазме соединение не обнаружено.

Таблица 9с. Медианные концентрации в плазме (нг/мл), полученные после перорального введения различных соединений крысам при 5 мг/кг

Испыту- емый объект	Раство- ритель	Время (час)								
		0,25	0,5	1	2	4	6	8	12	24
Соеди- нение I	В	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Примечание: растворители В и С те же, что и в табл. 8а.
Определение параметров ПДМВ (ADME).

Оценка некоторых *in vitro* параметров ПДМВ (поглощение, распределение, метаболизм и выделение (ADME)) для соединения I проведена BioFocus (Saffron Walden, UK). Результаты указывают, что соединение I быстро выводится гепатоцитами человека и что оно имеет пониженную предрасположенность для зависящего от времени ингибирования цитохрома P450.

Таблица 10. Данные испытаний на стабильность в гепатоцитах человека для соединения I

Испытуемый препарат	T _{1/2} (мин)	Средний собственный клиренс (мкл/мин/миллион клеток)	Средний печеночный коэффициент очистки
Соединение I	34	41	0,85

Таблица 11а. Обобщенные результаты исследований ингибирования CYP3A4 соединения I (представленные результаты являются средним арифметическим по двум опытам)

Испытуемый препарат	0 мин прединкубации			30 мин прединкубации	
	IC ₅₀ (мкМ)	15 мкМ, % ингибирования		IC ₅₀ (мкМ)	15 мкМ, % ингибирования
Справочное соединение А	>15	41		0,4	92
Соединение I	>15	31		7,8	54

Примечание: справочное соединение А: 1-(4-((2-((7-метил-1Н-индазол-5-ил)амино)пиримидин-4-ил)окси)нафталин-1-ил)-3-(3-(2-метилбут-3-ин-2-ил)-1-(п-толил)-1Н-пиразол-5-ил)мочевина (Fyfe, M. C. T., et al. WO 2014/033447).

Таблица 11b. Обобщенные результаты исследований ингибирования CYP2C9 соединения I (представленные результаты являются средним арифметическим по двум опытам)

Испытуемый препарат	0 мин преинкубации			30 мин преинкубации	
	IC ₅₀ (мкМ)	15 мкМ, % ингибирования		IC ₅₀ (мкМ)	15 мкМ, % ингибирования
Справочное соединение А	>5	31 ^[†]		1,4	66 ^[†]
Соединение I	>15	21		>15	37

Примечание: справочное соединение А: как и в табл. 11а.

[†] при 15 мкМ наблюдается осадок, поэтому указано ингибирование при 5 мкМ.

Исследования ингибирования hERG

Соединение I испытывают на ингибирование специфических калиевых каналов человека (hERG) с использованием метода электрофизиологии пэтч-кламп IonWorks™ при Essen Bioscience (Welwyn Garden City, England).

Таблица 12. Результаты ингибирования hERG для соединения I

Испытуемый препарат	IC ₅₀ (мкМ)	Ингибирование при 3 мкМ, %
Соединение I	>3,0	-12±4

Анализ метаболитов

Исследования проведены BioFocus (Saffron Walden, UK) для определения метаболизма соединения I после инкубации с крысой, яванской макакой (*Cynomolgus macaque*) или гепатоцитами человека.

Проводят отдельные инкубации (n=3) соединения I (начальная концентрация 10 мкМ) или ДМСО-контроля с криоконсервированными гепатоцитами из каждого вида (0,5 миллиона клеток/мл) при 37°C в течение 0, 60 и 90 мин перед остановкой реакцией, и соединение экстрагируют ацетонитрилом. Перед проведением анализа копии образца объединяют.

Потенциальные метаболиты идентифицируют с использованием времяпролетного (TOF) и тройного квадрупольного (TQ) масс-спектрометров.

Результаты показывают, что соединение I образует 9 метаболитов в гепатоцитах, 8 из которых являются результатом окисления полиэтиленгликолевой цепочки амидного остатка. Другой метаболит, наблюдаемый преимущественно в гепатоцитах яванской макаки, возникает через окисление на 5-(трет-бутил)-2-метокси-3-(метилсульфонамидо)фенильном фрагменте. Таким образом, не было отмечено никаких продуктов, которые могли бы быть связаны с метаболизмом при нафталиновом остатке, с явлением, которое приводит к гепатотоксичности, ассоциирующей с р38α ингибитором BIRB796 (Iwano, S., et al., J. Appl. Toxicol. 2011, 31, 671-677). Все метаболиты, идентифицированные при инкубации гепатоцитов человека, также обнаружены при инкубациях или в крысе, или с гепатоцитами яванской макаки.

Оценка мутагенности (Испытание на обратные мутации у бактерий)

Исследования проведены Sequani (Ledbury, Herefordshire, UK) с целью оценки соединения I по его способности вызывать мутации двух гистидин-зависимых ауксотрофных мутантов *Salmonella typhimurium*, линии TA98 и TA100, in vitro.

Отбор мутаций проводят с использованием метода внесения в чашки как в присутствии, так и в отсутствие микса S-9 (постмитохондриальная фракция печени, полученная из печени крыс, обработанных Aroclor 1254). Бактерий подвергают воздействию испытуемого соединения, растворенного в диметилсульфоксиде, и этот растворитель также используют в качестве негативного контроля. Уровни используемых доз составляют 0,32, 1,6, 8, 40, 200, 1000 или 5000 мкг/чашка.

Подвергаемые анализу уровни обработки испытуемого соединения ограничены от нерастворимости до 1000 мкг/чашка, так как при концентрации 5000 мкг/чашка наблюдают обильный осадок, мешающий выставлению бального показателя колониям. Осадок также отмечен в обеих линиях при концентрации 1000 мкг/чашка в присутствии и в отсутствии микса S-9.

Соединение I продуцирует не зависящее от дозы или статистически значимое повышение в ревертантных колониях в каждой линии *Salmonella typhimurium* в присутствии или в отсутствие микса S-9.

Изучение гидролитической стабильности

Химическую стабильность соединения I оценивают в смеси ДМСО и воды (3:1) при концентрации испытуемого соединения 1 мг/мл.

Общая методика ВЭЖХ.

Agilent, Waters X-Select C18, 2,5 мкм, колонка 4,6×30 мм, 4-х минутный способ, 5-95% MeCN/вода (0,1%-ная муравьиная кислота).

Скорость потока 2,5 мл/мин.

Температура колонного термостата 40°C.

Детектирование 254 нм.

Приготовление образца.

Образец испытуемого соединения (1,0 мг) растворяют в 750 мкл ДМСО. Медленно добавляют воду (250 мкл), обеспечивая отсутствие образования осадка.

Регистрация стабильности.

Аликвоту 50 мкл испытуемого раствора отбирают и анализируют в двух параллельных опытах путем ввода 5 мкл пробы ВЭЖХ. Записывают площадь пика для испытуемого соединения после ручного интегрирования соответствующих УФ-следовых количеств.

Испытуемый раствор нагревают при перемешивании при 60°C и отбирают аликвоту 50 мкл для анализа ВЭЖХ через временные точки 5 и 24 ч. Во всех случаях используют введение 5 мкл пробы и образцы анализируют в двух параллельных опытах.

Площади пиков для испытуемых соединений записывают при двух последовательных временных точках и рассчитывают % разложения из % изменения площади пика во времени.

Справочное соединение В (3-этинил-5-((4-(3-(3-изопропил-1-(п-толил)-1Н-пиразол-5-ил)уреидо)нафталин-1-ил)-окси)пиримидин-2-ил)амино)-N-(2-морфолиноэтил)бензамид) включают в каждое исследование стабильности в качестве контроля, чтобы подтвердить достоверность исследования. В отличие от соединений настоящего изобретения это справочное соединение подвергается значительному разложению при условиях опыта.

Результаты исследования представлены ниже в таблице.

Испытуемое соединение	Время (мин)	% оставшегося исходного соединения
Справочное Соединение В	0	100
	300	82
	1440	36
Соединение I	0	100
	300	100
	1440	100

Сокращения

AcOH		Ледяная уксусная кислота
aq	водн.	водный
5-ASA	5-АСК	5-Аминосалициловая кислота
ATP	АТФ	Аденозин-5'-трифосфат
EALF	ЖЕАЛ	Жидкость бронхоальвеолярного лаважа
BID		Дважды в сутки (два раза в день)
BINAP		2,2'-бис(дифенилфосфино)-1,1'-бинафтил- (бензотриазол-1-илокси) трис (диметиламино)-фосфония гексафторфосфат
br	уш.	уширенный
BrdU	БДУ	5-бром-2'-деоксиуредин
BSA	БСА	Бычий сывороточный альбумин
CatCart®		Каталитический картридж
CDI	КДИ	1,1-карбонилидиимидазол
COPD	ХОЗЛ	хроническое обструктивное заболевание легких
d	д	дублет
dba		дибензилиденацетон
DBU	ДБУ	1,8-диазабисцикло[5.4.0]ундец-7-ен
DCC	ДЦК	дициклогексилкарбодиимид
DCM	ДХМ	дихлорметан
DIAD	ДИАД	Диизопропилазодикарбоксилат
DIPEA	ДИПЭА	диизопропилэтиламин
DMAP	ДМАП	4-диметиламинопиридин
DMEM		модифицированная по способу Дульбекко среда Игла
DMF	ДМФА	N,N-диметилформамид
DMSO	ДМСО	диметилсульфоксид
DPPA	ДФФА	дифенилфосфониазид
d-U937 cells	Клетки d-U937	ФМА-дифференцированные клетки U-937
EDTA	ЭДТУК	Этилендиаминтетрауксусная кислота
ELISA		Ферментный иммуносорбентный анализ
(ES ⁻)		Ионизация электрораспылением, отрицательная мода
(ES ⁺)		Ионизация электрораспылением, положительная мода
Et		этил
Et ₃ N		триэтиламин
EtOAc		этилацетат
EtOH		этанол
FACS		Сортировка клеток с активацией флуоресценцией
FBS	ФБС	фетальная бычья сыворотка
FCS	ФТС	Фетальная телячья сыворотка
fMLP	ФМЛФ	формил-метионил-лейцил-фенилаланин

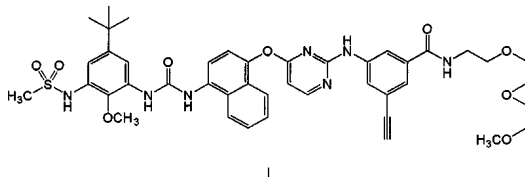
FRET	РПЭФ	Резонансный перенос энергии флуоресценции
GSK3 α		Глюкоген-синтаза-киназа 3 α
HBEC		Первичные клетки бронхального эндотелия человека
HBSS		Сбалансированный солевой раствор Хэнка
HPLC	ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
HPMC	ГПМЦ	Гидроксипропилметилцеллюлоза
h или hr		Час (часы)
HATU		2-(1H-7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуридия гексафторфосфат
HOAt		1-гидрокси-7-азабензотриазол
HOBT		гидроксibenзотриазол
HRP		Пероксидаза хрена
HRV	ЧРВ	Человеческий риновирус
ICAM-1		Молекула межклеточной адгезии 1
IFN γ		интерферон- γ
IL		Интерлейкин
iPrOAc		изопропилацетат
JNK		c-jun N-терминальная киназа
LC		Жидкостная хроматография
Lck		Лимфоцит-специфичная протеинтирозинкиназа
LPS	ЛПС	липополисахарид
m	м	мультиплет
(M+H) ⁺		Протонированный молекулярный ион
MAPK		Митоген-активируемая
MAPKAP-K2		Митоген-активируемая протеинкиназа-активируемая протеинкиназой-2
mCPBA	М-ХНЕК	мета-хлорнадбензойная кислота
Me		Метил
MeCN		ацетонитрил
MeOH		метанол
MHz	МГц	мегагерц
min	мин	минута (ы)
MMAD	ММАД	Масс-медианный аэродинамический диаметр
MOI	МЭ	Множественность заражения
MPO	МПО	миелопероксидаза
MTT		3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолийбромид
MS	МС	Масс-спектрометрия
m/z		Отношение заряда к массе
NMP	N-МП	N-метилпирролидон
NMR	ЯМР	Ядерный магнитный резонанс (спектроскопия)
OD	ОП	Оптическая плотность
PBMC	МКПК	Мононуклеарные клетки периферической крови
PBS	ФСВ	Фосфатно-солевой буфер
Ph		фенил
PNA	ФГА	фитогемагглютинин
PMA	ФМА	Форболмиристатацетат
PTSA	п-ТСК	4-метилбензолсульфоновая кислота (пара-толуолсульфоновая кислота)
PyBOP		(бензотриазол-1-илокси) трипирролидинфосфония гексафторфосфат
q	кв	Квартет
rt или RT		Комнатная температура
RP HPLC	ОФ-ВЭЖХ	Обращенно-фазная высокоэффективная жидкостная хроматография
Rpm	об/мин	Обороты в минуту
RPMI		Roswell Park Memorial Institute
RSV	РСВ	Респираторно-синцитиальный вирус
s	с	синглет
sat или satd		насыщенный

SCID	ТКИН	Тяжелая комбинированная иммунodeficiency
SCX		Твердая катионообменная (смола)
SDS	ДСН	Додецилсульфат натрия
S ₄ Ar		Нуклеофильное ароматическое замещение
Syk		Тирозинкиназа селезенки
t	т	триплет
T3P		1-циклический ангидрид пропанфосфоновой кислоты
TBAF	ТБАФ	тетрабутиламонийфторид
TBDMS		трет-бутилдиметилсилил
TCID ₅₀		50%-ная инфицирующая доза культуры ткани
TEA	ТЭА	триэтиламин
THF	ТГФ	тетрагидрофуран
TGA	ТФУК	Трифторуксусная кислота
TGFβ		Трансформирующий ростовой фактор бета
TIPS		триизопропилсилил
TMB		3, 3', 5, 5'-тетраметилбензидин
TMS-Cl		триметилсилилхлорид
TNFα		Фактор некроза опухолей альфа

Префиксы n-, s-, i-, t- и tert- имеют свои обычные значения: нормальный, вторичный, изо-, и третичный.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы I



или его фармацевтически приемлемая соль, или его изотопное производное, которое является изотопно-обогащенным или меченным одним или несколькими атомами дейтерия.

2. Соединение по п.1, которое представляет собой 3-((4-((4-(3-(5-(трет-бутил)-2-метокси-3-(метилсульфонамидо)фенил)уреидо)нафталин-1-ил)окси)пиримидин-2-ил)амино)-5-этинил-N-(2-(2-(2-метокси-этокси)этил)бензамид.

3. Фармацевтический препарат, содержащий соединение по п.1, или его фармацевтически приемлемую соль, или изотопное производное, являющееся изотопно-обогащенным или меченным одним или несколькими атомами дейтерия, в смеси с фармацевтически приемлемым адъювантом, разбавителем или носителем.

4. Применение соединения по п.1, или его фармацевтически приемлемой соли, или его изотопного производного, которое является изотопно-обогащенным или меченным одним или несколькими атомами дейтерия, для лечения или предупреждения воспалительного заболевания.

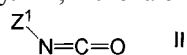
5. Применение по п.4, где воспалительное заболевание выбирают из перечня, включающего кистозный фиброз, легочную гипертензию, саркоидоз легких, идиопатический легочный фиброз, ХОЗЛ (COPD) (включая хронический бронхит и эмфизему), астму, детскую астму, atopический дерматит, аллергический дерматит, контактный дерматит или псориаз, аллергический ринит, ринит, синусит, конъюнктивит, аллергический конъюнктивит, сухой кератоконъюнктивит (сухость глаза), глаукому, диабетическую ретинопатию, макулярный отек (включая диабетический макулярный отек), окклюзию центральной вены сетчатки (ОЦВС (CRVO)), сухую и/или влажную форму возрастной макулярной дегенерации (ВМД (AMD)), послеоперационное воспаление после удаления катаракты, увеит (включая задний, передний и панuveит), отторжение роговичного и лимбального трансплантата, глютензависимую энтеропатию (глютенная болезнь), эозинофильный эзофагит, желудочно-кишечные проявления реакции "трансплантат против хозяина", болезнь Крона и неспецифический язвенный колит.

6. Применение по п.4 или 5, где воспалительным заболеванием является увеит, сухой кератоконъюнктивит (сухость глаз), болезнь Крона или неспецифический язвенный колит.

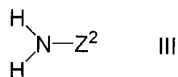
7. Применение соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли или его изотопного производного, которое является изотопно-обогащенным или меченным одним или несколькими атомами дейтерия, для получения лекарственного средства для лечения или предупреждения воспалительного заболевания, определенного в любом из пп. 4-6.

8. Способ лечения или предупреждения воспалительного заболевания, определенного в любом из пп.4-6, включающий введение субъекту эффективного количества соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли или его изотопного производного, которое является изотопно-обогащенным или меченым одним или несколькими атомами дейтерия.

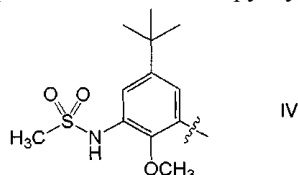
9. Способ получения соединения формулы I, включающий взаимодействие соединения формулы II



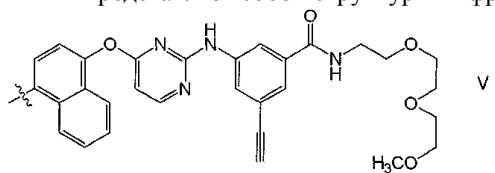
с соединением формулы III



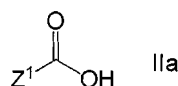
где один из заместителей Z^1 и Z^2 представляет собой структурный фрагмент формулы IV



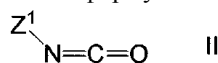
и другой из заместителей Z^1 и Z^2 представляет собой структурный фрагмент формулы V



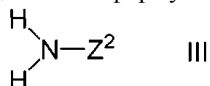
10. Способ получения соединения формулы I, включающий взаимодействие соединения формулы IIa



где Z^1 имеет значения, определенные в п.9, с подходящим азидобразующим агентом, с последующей без выделения термической перегруппировкой промежуточного ацилазида (формулы $\text{Z}^1\text{-C(O)-N}_3$) с образованием in situ соединения формулы II

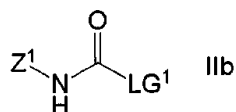


которое затем вводят в реакцию с соединением формулы III

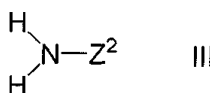


которое определено в п.9.

11. Способ получения соединения формулы I, включающий взаимодействие соединения формулы IIb

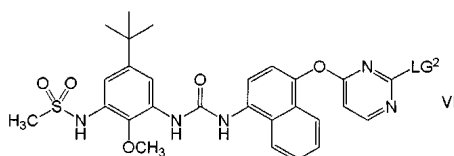


где LG^1 представляет собой уходящую группу и Z^1 имеет значения, определенные в п.9, с соединением формулы III

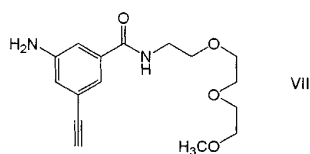


которое определено в п.9.

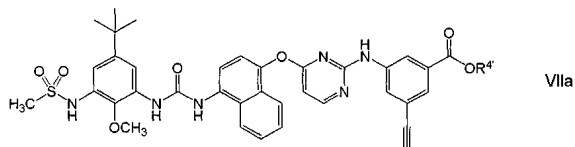
12. Способ получения соединения формулы I, включающий взаимодействие соединения формулы VI



где LG^2 представляет собой уходящую группу, с соединением формулы VII



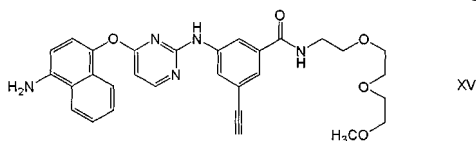
13. Способ получения соединения формулы I, включающий взаимодействие соединения формулы VIIa



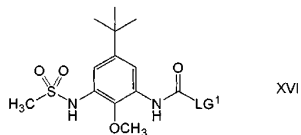
где R^{4'} представляет собой H или C₁₋₃-алкильную группу,
с соединением формулы VIIb



14. Способ по п.11, который включает взаимодействие соединения формулы XV

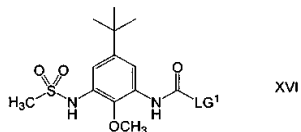


с соединением формулы XVI



где LG¹ имеет значения, определенные в п.11.

15. Соединение формулы XVI



где LG¹ представляет собой имидазолил, хлор или арилокси.

16. Соединение формулы XVI по п.15, где LG¹ представляет собой феноксигруппу.

