

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **032694**(13) **B1**

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2019.07.31**

(21) Номер заявки  
**201790660**

(22) Дата подачи заявки  
**2015.10.01**

(51) Int. Cl. **C07D 213/74** (2006.01)  
**A61K 31/44** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)

### (54) ИНГИБИТОР КИНАЗ

(31) **1417344.7; 1510694.1**

(32) **2014.10.01; 2015.06.18**

(33) **GB**

(43) **2017.07.31**

(86) **PCT/GB2015/052877**

(87) **WO 2016/051188 2016.04.07**

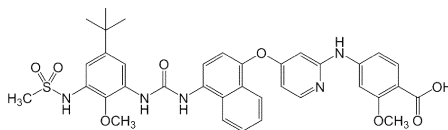
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**РЕСПАЙВЕРТ ЛИМИТЕД;  
ТОПАЙВЕРТ ФАРМА ЛИМИТЕД  
(GB)**

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

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

(56) WO-A1-2015092423  
WO-A1-02083628  
WO-A1-2014027209

(57) Представлено соединение формулы I



которое обладает противовоспалительной активностью (например, вследствие ингибирования одного или нескольких представителей: семейства ферментов митоген-активируемых протеинкиназ p38; Syk-киназы и представителей семейства тирозинкиназ Src) и обладает применением в терапии, включая применение в фармацевтических комбинациях, особенно при лечении воспалительных заболеваний, включающих воспалительные заболевания легких, глаз и кишечника.

**B1****032694****032694****B1**

Изобретение, в числе прочего, относится к соединению, которое представляет собой противовоспалительное средство (например, вследствие ингибирования одного или нескольких представителей семейства ферментов митоген-активируемых протеинкиназ p38 (такие соединения в настоящем документе обозначают как ингибиторы MAP-киназ p38), например их подтипа альфа-киназы; Syk-киназы и семейства тирозинкиназ Src). Изобретение также относится к применению этого соединения в терапии, включая монотерапию и способы комбинированного лечения, особенно при лечении воспалительных заболеваний, включая воспалительные заболевания легких (такие как астма и хроническое обструктивное заболевание легких (COPD)), глаз (такие как увеит или сухой кератоконъюнктивит (болезнь сухих глаз, также известная как ксерофтальмия)) и желудочно-кишечного тракта (такие как болезнь Крона и язвенный колит).

Перечисление списка или обсуждение в настоящем описании ранее опубликованных документов не следует в обязательном порядке считать подтверждением того, что настоящий документ является частью предшествующего уровня техники или представляет собой общий уровень знаний.

Идентифицировано четыре изоформы MAPK p38 (альфа, бета, гамма и дельта, соответственно), где каждая демонстрирует уникальный профиль экспрессии в тканях. Изоформы альфа и бета MAPK p38 выявлены во всем организме, присутствуют во множестве различных типов клеток, и их ингибирует ряд ранее описанных низкомолекулярных соединений. Ранее производимые классы ингибиторов являлись высокотоксичными ввиду широкого распространения этих изоформ в тканях, что приводило к побочному действию соединений. Некоторые из недавно выявленных ингибиторов демонстрируют улучшенную селективность в отношении изоформ альфа и бета MAPK p38 и обладают более широкими пределами безопасности.

Полагают, что MAP-киназа p38 играет основную роль во множестве сигнальных путей, которые вовлечены в инициацию и поддержание хронического, длительного воспаления при заболеваниях человека, например при тяжелой астме, COPD и воспалительном заболевании кишечника (IBD). Существует множество литературных источников, демонстрирующих, что MAP-киназу p38 активирует ряд провоспалительных цитокинов и что эта активация приводит к накоплению и высвобождению дополнительных провоспалительных цитокинов. Фактически, данные нескольких клинических исследований демонстрируют благоприятные изменения активности заболеваний у пациентов при лечении ингибиторами MAP-киназ p38. Например, у Smith описано ингибирующее действие ингибиторов MAP-киназ p38 на высвобождение TNF $\alpha$  (но не IL-8) из PBMC человека (Smith S.J., Br. J. Pharmacol., 2006, 149:393-404).

Также предложено применение ингибиторов MAP-киназ p38 при лечении COPD и IBD. Доказано, что низкомолекулярные ингибиторы, направленные против MAPK p38 $\alpha/\beta$ , являются эффективными в отношении снижения различных параметров воспаления в

клетках и тканях, получаемых у пациентов с COPD, которые в основном не чувствительны к кортикостероидам (Smith S.J., Br. J. Pharmacol., 2006, 149:393-404);

препаратах биопсии пациентов IBD (Docena G. et al., J. Trans. Immunol., 2010, 162:108-115);

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

Irusen с коллегами также предположил возможность вовлечения MAPK p38 $\alpha/\beta$  в нечувствительность к кортикостероидам посредством снижения аффинности связывания рецепторов глюкокортикоидов (GR) в ядрах (Irusen E. et al., J. Аллергия Clin. Immunol., 2002, 109:649-657). Описаны клинические исследования воспалительных заболеваний с использованием ряда ингибиторов MAP-киназ p38, включая AMG548, BIRB 796, VX702, SCIO469 и SCIO323 (Lee M.R. and Dominguez C., Current Med. Chem., 2005, 12:2979-2994.). Однако основным препятствием, затрудняющим применение ингибиторов MAP-киназ p38 при лечении хронических воспалительных заболеваний человека, являлась токсичность, наблюдаемая у пациентов. Она была достаточно тяжелой, чтобы привести к отказу от клинических испытаний множества исследуемых соединений, включая все соединения, конкретно указанные выше.

COPD представляет собой патологическое состояние, при котором регистрируют, что лежащее в основе воспаление, по существу, устойчиво к противовоспалительному действию ингалируемых кортикостероидов. Таким образом, наилучшей стратегией при лечении COPD могла бы являться разработка средства, которое бы обладало собственным противовоспалительным действием и способностью увеличивать чувствительность тканей легких пациентов с COPD к ингалируемым кортикостероидам. Недавняя публикация Mercado et al. (2007; American Thoracic Society Abstract A56) демонстрирует, что сайленсинг MAPK p38 $\gamma$  обладает потенциалом для восстановления чувствительности к кортикостероидам. Таким образом, у использования ингибитора MAP-киназ p38 при лечении COPD может существовать двойное положительное действие для пациентов.

Множество пациентов с диагностированными астмой или COPD продолжают страдать от неконтролируемых симптомов и от обострений их медицинского состояния, которые могут приводить к госпитализации. Это происходит несмотря на использование наиболее передовых доступных в настоящее время схем лечения включающих комбинации продуктов ингалируемых кортикостероидов и длительно действующих  $\beta$ -агонистов. Данные, накопленные в течение последнего десятилетия, свидетельствуют, что наиболее вероятной причиной, по которой происходит обострение, является недостаточность примене-

ния эффективных мер против обуславливающего заболевания воспалительного компонента в легких. Учитывая установленную эффективность кортикостероидов в качестве противовоспалительных средств и, в частности, ингалируемых кортикостероидов при лечении астмы, эти изыскания стимулировали интенсивные исследования. Итоговые исследования выявили, что нечувствительные к кортикостероидам воспалительные изменения в легких пациентов вызывают определенные неблагоприятные воздействия окружающей среды. Примером является ответ, возникающий вследствие обуславливаемых вирусами инфекций верхних дыхательных путей (URTI), который имеет особое значение в увеличении заболеваемости, ассоциированной с астмой и COPD.

Ранее выявлено, что соединения, которые одновременно ингибируют активность киназ c-Src и Syk, являются эффективными средствами против репликации риновирусов (Charpton C.E. et al., WO 2011/158042) и что соединения, которые ингибируют p59-HCK, эффективны против репликации вируса гриппа (Charpton C.E. et al., WO 2011/070369). Взятые вместе с ингибированием MAPK p38 эти свойства являются особенно привлекательными свойствами, которыми должны обладать соединения, предназначенные для лечения пациентов с хроническими заболеваниями органов дыхания.

Определенные ингибиторы MAPK p38 также описаны в качестве ингибиторов репликации респираторно-синцитиального вируса (Cass L. et al., WO 2011/158039).

Точная этиология IBD является неизвестной, но полагают, что оно обусловлено генетическими факторами и факторами окружающей среды, которые взаимодействуют, способствуя избыточному и плохо контролируемому воспалительному ответу слизистой, направленному против компонентов внутрикишечной микрофлоры. Этот ответ опосредован инфильтрацией воспалительных нейтрофилов, дендритных клеток и Т-клеток с периферии. p38 стала очевидной мишенью исследований в моделях IBD ввиду ее повсеместной экспрессии в воспалительных клетках. Исследования, в которых изучали эффективность ингибиторов p38 в моделях IBD на животных и в образцах биопсии человека, полученных у пациентов IBD, выявили, что p38 может являться мишенью при лечении IBD (Hove T. ten et al., Gut, 2002, 50:507-512, Docena G. et al., J. Trans. Immunol., 2010, 162:108-115). Однако эти изыскания не полностью согласуются с другими группами, сообщающими об отсутствии действия ингибиторов p38 (Malamut G. et al., Dig. Dis. Sci., 2006, 51:1443-1453). Клиническое исследование у пациентов с болезнью Крона с использованием ингибитора p38 альфа BIRB796 продемонстрировало потенциальное клиническое преимущество с улучшением уровней С-реактивного белка. Однако это улучшение было неустойчивым, возвращаясь к исходному уровню на неделе 8 (Schreiber S. et al., Clin. Gastro. Hepatology, 2006, 4:325-334). Небольшое клиническое исследование, в котором изучали эффективность CNI-1493, ингибитора p38 и Jnk, у пациентов с тяжелой болезнью Крона, продемонстрировало значимое улучшение клинических показателей через 8 недель (Hommes D. et al. Gastroenterology, 2002 122:7-14).

Известно, что Т-клетки играют ключевую роль в опосредовании воспаления желудочно-кишечного тракта. Первая работа Powrie с коллегами продемонстрировала, что перенос наивных CD4<sup>+</sup>-клеток животным с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) приводит к развитию колита, который зависит от присутствия комменсальных бактерий (Powrie F. et al. Int. Immunol. 1993 5:1461-71). Кроме того, исследование мембран слизистой пациентов с IBD продемонстрировало повышение уровня CD4<sup>+</sup>-клеток, которые представляли собой или Th1 (IFN $\gamma$ /IL-2), или Th2 (IL5/TGF $\beta$ ), преобладающих в зависимости от того страдал ли пациент болезнью Крона, или язвенным колитом (Fuss I.J. et al. J. Immunol. 1996 157:1261-70.). Подобным образом, известно, что Т-клетки играют ключевую роль в воспалительных нарушениях глаз, где в нескольких исследованиях продемонстрировали увеличенные уровни ассоциированных с Т-клетками цитокинов (IL-17 и IL-23) в сыворотке пациентов с болезнью Бехчета (Chi W. et al. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2008 49:3058-64). В поддержку этих наблюдений Direskeneli с коллегами продемонстрировали, что у пациентов с болезнью Бехчета в периферической крови присутствует увеличенное количество клеток Th17 и сниженное количество клеток T<sub>per</sub> (Direskeneli H. et al. J. Allergy Clin. Immunol. 2011 128:665-6).

Одним из подходов к ингибированию активации Т-клеток является воздействие на киназы, которые вовлечены в активацию комплекса передачи сигнала от Т-клеточных рецепторов. Известно, что в этом пути ключевую роль играют киназы семейств Syk и Src, где киназы семейства Src, Fyn и Lck, являются первыми сигнальными молекулами, активируемыми ниже Т-клеточного рецептора в каскаде (Barber E.K. et al. PNAS 1989, 86:3277-81). Они инициируют фосфорилирование тирозина Т-клеточного рецептора, приводя к накоплению киназы семейства Syk, ZAP-70. Исследования на животных показали, что нокаут ZAP-70 приводит к фенотипу SCID (Chan A.C. et al. Science. 1994, 10; 264(5165):1599-601).

Клиническое испытание у пациентов с ревматоидным артритом с использованием ингибитора Syk фостаматиниба продемонстрировало потенциал Syk в качестве мишени для противовоспалительного действия, где пациенты продемонстрировали улучшенный клинический исход и сниженные уровни IL-6 и MMP-3 в сыворотке (Weinblatt M.E. et al. Arthritis Rheum. 2008 58:3309-18). Syk-киназа широко экспрессирована в клетках кроветворной системы, преимущественно в В-клетках и зрелых Т-клетках. Осуществляя взаимодействие через иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM), она играет важную роль в регуляции размножения Т-клеток и В-клеток, а также в опосредовании передачи сигнала с иммунорецепторов в воспалительные клетки. Активация Syk приводит к высвобождению IL-6

и ММР - воспалительных медиаторов, повышение уровня которых, как правило, наблюдают при воспалительных нарушениях, включая IBD и ревматоидный артрит (Wang Y.D. et al World J. Gastroenterol. 2007; 13: 5926-5932, Litinsky I. et al., Cytokine, 2006, Jan 33:106-10).

В настоящее время также известно, что в дополнение к ключевой роли в событиях клеточной сигнализации, которые контролируют активность провоспалительных каскадов, киназные ферменты регулируют активность ряда клеточных функций, включая поддержание целостности ДНК (Shilo Y. Nature Reviews Cancer, 2003, 3: 155-168) и координацию сложных процессов клеточного деления. Фактически выявлено, что определенные ингибиторы киназ (так называемых "киназ Olaharski") изменяют частоту формирования микронуклеуса in vitro (Olaharski A.J. et al., PLoS Comput. Biol., 2009, 5(7), e1000446; doi:10.1371/journal.pcbi.1000446). Формирование микронуклеуса вовлечено или ассоциировано с нарушением процессов митоза и, таким образом, нежелательно. Выявлено, что особенно значимым фактором, который увеличивает вероятность того, что ингибитор киназы будет способствовать формированию микронуклеуса, является ингибирование киназы гликогенсинтетазы 3 $\alpha$  (GSK3 $\alpha$ ). Также опубликовано, что формированию микронуклеуса способствует ингибирование киназы GSK3 $\beta$  посредством РНКи (Tighe A. et al., BMC Cell Biology, 2007, 8:34).

Хотя неблагоприятные воздействия ингибирования киназ Olaharski, таких как GSK3 $\alpha$ , можно ослаблять оптимизацией дозы и/или изменением маршрута введения молекулы, было бы целесообразно идентифицировать дополнительные терапевтически пригодные молекулы со слабым или незначительным ингибированием киназ Olaharski, таких как GSK3 $\alpha$ , и/или со слабым или незначительным нарушением процессов митоза (например, как измеряют при анализе митоза).

В качестве ингибирующих одну или несколько киназ описаны различные соединения, включая производные мочевины. Примеры таких соединений можно найти в 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, WO 2007/053394, WO 2013/050756, WO 2013/050757, WO 2014/027209, WO 2014/033446, WO 2014/033447, WO 2014/033448, WO 2014/033449, WO 2014/076484, WO 2014/140582, WO 2014/162121, WO 2014/162122, WO 2014/162126 и WO 2015/092423.

Дополнительные примеры можно найти в статьях, опубликованных в следующих источниках:

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, 17, 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);

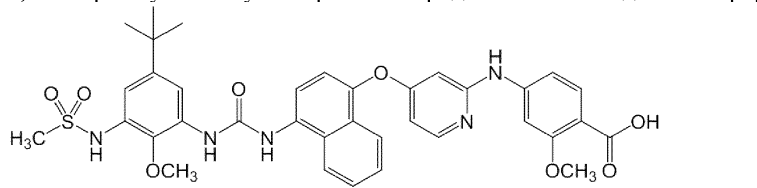
J. Chem. Inf. Model. (2011, 51, 115-129) и

Br. J. Pharmacol. (2015, 172, 3805-3816).

Однако остается потребность в идентификации и разработке новых ингибиторов киназ, особенно альтернативных ингибиторам MAP-киназ p38, которые подходят для лечения воспаления. Особенно необходимы такие ингибиторы, которые обладают улучшенным терапевтическим потенциалом по сравнению с доступными в настоящее время терапевтическими средствами или, в частности, которые демонстрируют более высокий терапевтический индекс (например, ингибиторы, по меньшей мере, с равной эффективностью и в одном или нескольких отношениях менее токсичных при соответствующей терапевтической дозе, чем предшествующие средства).

В данной работе авторы неожиданно выявили, что содержащая бензойную кислоту и анилин диарилмочевина ингибирует одну или несколько из MAP-киназ p38, киназ семейств Syk и Src и, таким образом, обладает хорошими противовоспалительными свойствами.

Таким образом, по первому аспекту изобретения предоставлено соединение формулы I



или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или изотопное производное, где это соединение далее в настоящем документе может быть указано как "соединение по изобретению".

Фармацевтически приемлемые соли, которые можно указать, включают соли присоединения кислот и соли присоединения оснований. Такие соли можно формировать общепринятыми способами, например

посредством реакции формы свободной кислоты или свободного основания соединения формулы I с одним или несколькими эквивалентами соответствующей соли или основания, необязательно в растворителе или в среде, в которых соль является нерастворимой, с последующим удалением указанного растворителя или указанной среды стандартными способами (например, при пониженном давлении, посредством лиофилизации или посредством фильтрования). Соли также можно получать посредством обмена противоиона соединения формулы I в форме соли на другой противоион, например, с использованием подходящей ионообменной смолы.

Примеры фармацевтически приемлемых солей включают соли присоединения кислот, получаемые из неорганических кислот и органических кислот, и соли, получаемые с металлами.

Во избежание неоднозначного толкования соединение формулы I может содержать указанные атомы в любой из их природных или неприродных изотопных форм. В этом отношении варианты осуществления изобретения, которые можно указать, включают варианты осуществления изобретения, в которых:

(а) соединение формулы I не является изотопно обогащенным или меченым в отношении любых атомов соединения; и

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

Указания в настоящем документе на "изотопное производное" относятся ко второму из этих двух вариантов осуществления. В конкретных вариантах осуществления изобретения соединение формулы I является изотопно обогащенным или меченым (в отношении одного или нескольких атомов соединения) одним или несколькими стабильными изотопами. Таким образом, соединения по изобретению, которые можно указать, включают, например, соединения формулы I, которые являются изотопно обогащенными или мечеными одним или несколькими атомами, такими как дейтерий или т.п.

Соединение формулы I могут демонстрировать таутомерию. Все таутомерные формы и их смеси включены в объем изобретения.

Если не указано иначе, алкильные группы и алкоксигруппы, как определено в настоящем документе, могут состоять из неразветвленной цепи или, когда присутствует достаточное количество (т.е. минимум три) атомов углерода, являться разветвленными. Конкретные алкильные группы, которые можно указать, включают, например, метил, этил, н-пропил, изопропил, бутил, н-бутил и трет-бутил. Конкретные алкоксигруппы, которые можно указать, включают, например, метокси, этокси, пропокси и бутокси.

Если не указано иначе, алкиленовые группы, как определено в настоящем документе, могут состоять из неразветвленной цепи или, когда присутствует достаточное количество (т.е. минимум два) атомов углерода, являться разветвленными. В конкретных вариантах осуществления изобретения алкилен относится к алкилену с неразветвленной цепью.

Если не указано иначе, точкой связывания арильной группы может являться любой атом циклической системы. Однако когда арильные группы являются бициклическими или трициклическими, они связаны с остальной молекулой посредством ароматического кольца. C<sub>6-14</sub>арильные группы включают фенил, нафтил и т.п. Варианты осуществления изобретения, которые можно указать, включают варианты осуществления изобретения, в которых арил представляет собой фенил.

Если не указано иначе, термин "галоген" включает указание на фтор, хлор, бром или йод, в частности на фтор, хлор или бром, особенно фтор или хлор.

Название соединения формулы I представляет собой 4-((4-((4-(3-(5-(трет-бутил)-2-метокси-3-(метилсульфонамидо)фенил)уреидо)нафталин-1-ил)окси)пиридин-2-ил)амино)-2-метоксибензойная кислота, но также может представлять собой известное химическое наименование 4-[[4-[[4-[[5-трет-бутил-3-(метансульфонамидо)-2-метоксифенил]карбамоиламино]-1-нафтил]окси]-2-пиридил]амино]-2-метоксибензойная кислота.

Примеры солей соединения формулы I включают все фармацевтически приемлемые соли, такие как, без ограничения, соли присоединения сильных неорганических кислот, такие как соли HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и HBr (например, соли HCl или HBr) и соли присоединения сильных органических кислот, таких как метансульфоновая кислота.

Конкретные соли соединения формулы I, которые можно указать, включают соли соляной кислоты и соли натрия, аммония, кальция, магния, N-метилглюкамина ((2R,3R,4R,5S)-6-(метиламино)гексан-1,2,3,4,5-пентола) или бенетамина (N-бензил-2-фенэтиламина) (например, натриевые или аммонийные соли).

Таким образом, варианты осуществления изобретения, которые можно указать, включают гидрохлориды, натриевые, кальциевые, магниевые или аммонийные соли 4-((4-((4-(3-(5-(трет-бутил)-2-метокси-3-(метилсульфонамидо)фенил)уреидо)нафталин-1-ил)окси)пиридин-2-ил)амино)-2-метоксибензойной кислоты.

Более конкретные соли соединения формулы I, которые можно указать, включают гидрохлориды, натриевые и аммонийные соли.

Указания в настоящем документе на соединение по изобретению (соединение формулы I) предназначены для включения указаний на соединение и все фармацевтически приемлемые соли, сольваты и/или таутомеры указанного соединения, если по контексту не следует иначе. В этом отношении сольва-

ты, которые можно указать, включают гидраты.

Соединение по изобретению (соединение формулы I) представляет собой ингибитор MAP-киназ p38 (особенно подтипа альфа), Syk-киназы и киназ семейства Src, например Src и Lck, и, таким образом, пригодно в медицине, в частности при лечении воспалительных заболеваний. Таким образом, дополнительные аспекты изобретения, которые можно указать, включают приведенные ниже аспекты.

(а) Фармацевтическая композиция (фармацевтический состав), содержащая соединение формулы I, как определено выше в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или изотопное производное в смеси с фармацевтически приемлемыми вспомогательным средством, разбавителем или носителем.

(b) Комбинированный продукт, содержащий:

(А) соединение формулы I, как определено выше в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или изотопное производное; и

(В) другое терапевтическое средство, где каждый из компонентов (А) и (В) формулируют в смеси с фармацевтически приемлемыми вспомогательным средством, разбавителем или носителем.

В этом аспекте изобретения комбинированный продукт может представлять собой единую (комбинированную) фармацевтическую композицию или набор из компонентов.

Таким образом, этот аспект изобретения включает фармацевтическую композицию, содержащую соединение формулы I, как определено выше в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или изотопное производное и другое терапевтическое средство в смеси с фармацевтически приемлемыми вспомогательным средством, разбавителем или носителем (где эта композиция (состав 0 далее в настоящем документе) обозначают как "комбинированный препарат").

Также он включает набор компонентов, содержащий компоненты:

(i) фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы I, как определено выше в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или изотопное производное в смеси с фармацевтически приемлемыми вспомогательным средством, разбавителем или носителем; и

(ii) фармацевтическая композиция, содержащая другое терапевтическое средство в смеси с фармацевтически приемлемыми вспомогательным средством, разбавителем или носителем, где каждый из компонентов (i) и (ii) предоставлены в форме, подходящей для введения в сочетании с другим компонентом.

Таким образом, компонент (i) из набора компонентов представляет собой компонент (А) в смеси с фармацевтически приемлемыми вспомогательным средством, разбавителем или носителем выше. Подобным образом, компонент (ii) представляет собой компонент (В) в смеси с фармацевтически приемлемыми вспомогательным средством, разбавителем или носителем выше.

(с) Способ получения фармацевтической композиции (состава) из аспекта (а) выше, где указанный способ включает этап смешивания соединения формулы I, как определено выше в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемых соли, сольвата или изотопного производного с фармацевтически приемлемыми вспомогательным средством, разбавителем или носителем.

Варианты осуществления этого аспекта изобретения, которые можно указать, включают варианты осуществления, в которых фармацевтически приемлемые вспомогательное средство, разбавитель или носитель представляют собой приемлемые для местного применения вспомогательное средство, разбавитель или носитель (и/или где способ предназначен для получения местного фармацевтического состава, т.е. фармацевтического состава, адаптированного для местного применения).

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

(е) Соединение формулы I, как определено выше в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или изотопное производное или фармацевтический состав или комбинированный продукт, как определено по отношению к аспектам (а) или (b) по изобретению, для применения в лечении или профилактике воспалительного заболевания.

(f) Применение соединения формулы I, как определено выше в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемых соли, сольвата или изотопного производного или фармацевтического состава или комбинированного продукта, как определено по отношению к аспектам (а) или (b) по изобретению, для получения лекарственного средства для лечения или профилактики воспалительного заболевания.

(g) Способ лечения или профилактики воспалительного заболевания, где указанный способ включает введение индивидууму эффективного количества соединения формулы I, как определено выше в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемых соли, сольвата или изотопного производного или фармацевтического состава или комбинированного продукта, как определено по отношению к аспектам (а) или (b) по изобретению.

(h) Способ повышения чувствительности индивидуума к противовоспалительному действию кортикостероидов, где указанный способ включает введение индивидууму эффективного количества соединения формулы I, как определено выше в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемых соли, сольвата или изотопного производного или фармацевтического состава или комбинированного

продукта, как определено по отношению к аспектам (a) или (b) по изобретению.

Варианты осуществления этого аспекта изобретения, которые можно указать, включают варианты осуществления этого аспекта изобретения, в которых индивидуум представляет собой индивидуума, ставшего устойчивым к противовоспалительному действию кортикостероидов.

Указания в настоящем документе на "предотвращение воспалительного заболевания" включают указания на предотвращение (или снижение вероятности) рецидива воспалительного заболевания у индивидуума, который ранее страдал таким заболеванием (например, индивидуум, который ранее проходил лечение этого заболевания, например, лечение способом, описанным в (g) выше).

Таким образом, дополнительные аспекты изобретения, которые можно указать, включают приведенные ниже.

(i) Соединение формулы I, как определено выше в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или изотопное производное или фармацевтический состав или комбинированный продукт, как определено по отношению к аспектам (a) или (b) по изобретению, для применения для снижения вероятности рецидива воспалительного заболевания у индивидуума, который ранее проходил лечение этого заболевания (например, лечение соединением формулы I, как определено выше в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемыми солью, сольватом или изотопным производным или фармацевтическим составом или комбинированным продуктом, как определено по отношению к аспектам (a) или (b) по изобретению). (j) Применение соединения формулы I, как определено выше в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемых соли, сольвата или изотопного производного или фармацевтического состава или комбинированного продукта, как определено по отношению к аспектам (a) или (b) по изобретению, для получения лекарственного средства для снижения вероятности рецидива воспалительного заболевания у индивидуума, который ранее проходил лечение этого заболевания (например, лечение соединением формулы I, как определено выше в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемыми солью, сольватом или изотопным производным или фармацевтическим составом или комбинированным продуктом, как определено по отношению к аспектам (a) или (b) по изобретению).

(k) Способ снижения вероятности рецидива воспалительного заболевания у индивидуума, который ранее проходил лечение этого заболевания (например, лечение соединением формулы I, как определено выше в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемыми солью, сольватом или изотопным производным или фармацевтическим составом или комбинированным продуктом, как определено по отношению к аспектам (a) или (b) по изобретению), где указанный способ включает введение указанному индивидууму эффективного количества соединения формулы I, как определено выше в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемых соли, сольвата или изотопного производного или фармацевтического состава или комбинированного продукта, как определено по отношению к аспектам (a) или (b) по изобретению.

Составы.

В отношении аспектов (a) и (b) выше, разбавители и носители, которые можно указать, включают разбавители и носители, подходящие для парентерального, перорального, местного, слизистого и ректального введения.

Фармацевтические составы и комбинированные продукты по аспектам (a) и (b) выше можно получать, например, для парентерального, подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутрисуставного, интравитреального, периокулярного, ретробульбарного, субконъюнктивного, субтенонового, местного введения в глаза или периартикулярного введения, в частности в форме жидких растворов, эмульсий или суспензий; для перорального введения, в частности в форме таблеток или капсул, и особенно включая технологии, предназначенные для обеспечения направленного высвобождения лекарственных средств в кишечнике (Patel M.M. Expert Opin. Drug Deliv. 2011, 8 (10), 1247-1258); для топического, например легочного или интраназального, введения, в частности в форме порошков, назальных капель или аэрозолей и трансдермального введения; для местного введения в глаза, в частности в форме растворов, эмульсий, суспензий, мазей, имплантатов/вкладышей, гелей, желе или составов с липосомными микро-частицами (Ghate D.; Edelhauser H.F. Expert Opin. Drug Deliv. 2006, 3 (2), 275-287); для введения в глаза, в частности в форме биоразлагаемых и небiorазлагаемых имплантатов, липосом и наночастиц (Thrimawithana T.R. et al. Drug Discov. Today 2011, 16 (5/6), 270-277); для слизистого введения, например, в слизистую щек, сублингвальную или вагинальную слизистую и для ректального введения, например, в форме суппозиториев или клизм.

Фармацевтические составы и комбинированные продукты по аспектам (a) и (b) выше в целях удобства можно вводить в стандартной лекарственной форме и можно получать любым из способов, хорошо известных в фармацевтической области, например, как описано в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA., (1985). Составы для парентерального введения могут содержать в качестве эксципиентов стерильную воду или солевой раствор, алкиленгликоли, такие как пропиленгликоль, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла, получаемые из овощей растительного происхождения, гидрогенизированные нафталины и т.п. Составы для назального введения могут быть твердыми и могут содержать эксципиенты, например лактозу или декстран, или могут пред-

ставлять собой водные или масляные растворы для применения в форме назальных капель или дозируемых спреев. Типичные эксципиенты для буккального введения включают сахара, стеарат кальция, стеарат магния, прежелатинизированный крахмал и т.п.

Фармацевтические составы и комбинированные продукты, подходящие для перорального введения, могут содержать один или несколько физиологически совместимых носителей и/или эксципиентов и могут находиться в твердой или жидкой форме. Таблетки и капсулы можно получать с использованием связывающих средств, например патоки, гуммиарабика, желатина, сорбита, трагаканта или поливинилпирролидона; наполнителей, таких как лактоза, сахароза, кукурузный крахмал, фосфат кальция, сорбит или глицин; смазочных средств, таких как стеарат магния, тальк, полиэтиленгликоль или диоксид кремния; и поверхностно-активных веществ, таких как лаурилсульфат натрия. Жидкие композиции могут содержать общепринятые добавки, такие как суспендирующие средства, например сорбитный сироп, метилцеллюлоза, сахарный сироп, желатин, карбоксиметилцеллюлоза или пищевые жиры; эмульгаторы, такие как лецитин или гуммиарабик; растительные масла, такие как миндальное масло, кокосовое масло, масло печени трески, арахисовое масло; консерванты, такие как бутилированный гидроксианизол (БНА) и бутилированный гидрокситолуол (БНТ). Жидкие композиции можно инкапсулировать, например, в желатин с получением стандартной лекарственной формы.

Твердые пероральные лекарственные формы включают таблетки, разъемные капсулы с твердой оболочкой и мягкие эластичные желатиновые (SEG) капсулы. Такие разъемные капсулы с твердой оболочкой можно получать, например, из желатина или гидроксилпропилметилцеллюлозы (HPMC).

Как правило, в составе с твердой оболочкой концентрация желатина составляет приблизительно от 40 до 60% мас./мас., концентрация пластификатора (такого как глицерин, сорбит или пропиленгликоль) составляет приблизительно от 20 до 30% и концентрация воды составляет приблизительно от 30 до 40%. Также могут присутствовать другие материалы, такие как консерванты, красители, средства, обеспечивающие непрозрачность, и ароматизаторы. Жидкие наполнители содержат твердое лекарственное средство, которое является растворенным, солюбилизированным или диспергированным (с использованием суспендирующих средств, таких как пчелиный воск, гидрогенизированное касторовое масло или полиэтиленгликоль 4000), или жидкое лекарственное средство в носителях или комбинациях носителей, таких как минеральные масла, растительные масла, триглицериды, гликоли, полиолы и поверхностно-активные средства.

Соединение по изобретению можно вводить местно (например, в легкие, глаза или кишечник). Таким образом, варианты осуществления аспектов (a) и (b) выше, которые можно указать, включают фармацевтические составы и комбинированные продукты, которые адаптированы для местного применения. Такие составы включают составы, в которых эксципиенты (включая любое вспомогательное вещество, разбавитель и/или носитель) приемлемы для места применения.

Местное применение в легких можно проводить с использованием аэрозольного состава. Как правило, аэрозольные составы содержат активный ингредиент, суспендированные или растворенные в подходящем аэрозольном пропелленте, таком как хлорфторуглерод (CFC) или гидрофторуглерод (HFC). Подходящие пропелленты CFC включают трихлормонофторметан (пропеллент 11), дихлортетрафторэтан (пропеллент 114) и дихлордифторметан (пропеллент 12). Подходящие пропелленты HFC включают тетрафторэтан (HFC-134a) и гептафторпропан (HFC-227). Как правило, пропеллент составляет от 40 до 99,5%, например от 40 до 90% по массе от всей ингалируемой композиции. Состав может содержать эксципиенты, включая вспомогательные растворители (например, этанол) и поверхностно-активные вещества (например, лецитин, триолеат сорбитана и т.п.). Другие возможные эксципиенты включают полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, глицерин и т.п. Аэрозольные составы помещают в емкости и подходящую дозу доставляют посредством дозирующего клапана (например, поставляемого Bepak, Valois или 3M или, альтернативно, Aptar, Coster или Vari).

Также местное применение в легких можно проводить с использованием не находящегося под давлением состава, такого как водный раствор или суспензия. Его можно проводить посредством распылителя, например распылителя, который может являться ручным и переносным или для домашнего или больничного применения (т.е. непереносным). Состав может содержать эксципиенты, такие как вода, буферы, средства регуляции тоничности, средства регуляции pH, поверхностно-активные вещества и вспомогательные растворители. Как правило, суспензионные жидкие и аэрозольные составы (под давлением или не под давлением) содержат соединение по изобретению в высокодисперсной форме, например с  $D_{50}$  0,5-10 мкм, например приблизительно 1-5 мкм. Распределения размеров частиц можно представлять с использованием значений  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  и  $D_{90}$ . Медианное значение  $D_{50}$  распределений размеров частиц определяют как размер частиц в микрометрах, который делит распределение пополам. Распределение, получаемое посредством лазерной дифракции, более точно описывать как объемное распределение, и, таким образом, значение  $D_{50}$ , получаемое этим способом, более разумно обозначать как значение  $Dv_{50}$  (медиана для объемного распределения). Как используют в настоящем документе, значения  $Dv$  относятся к распределениям размеров частиц, определяемым с использованием лазерной дифракции. Подобным образом, значения  $D_{10}$  и  $D_{90}$ , используемые в контексте лазерной дифракции, обозначают значениями  $Dv_{10}$  и  $Dv_{90}$ , и они относятся к размеру частиц, для которого 10% распределения находится ниже значе-



ния  $D_{10}$  и 90% распределения находится ниже значения  $D_{90}$  соответственно.

Местное применение в легких также можно проводить с использованием сухого порошкового состава. Сухой порошковый состав содержит соединение по изобретению в высокодисперсной форме, как правило, с массовым средним аэродинамическим диаметром (MMAD) 1-10 мкм или  $D_{50}$  0,5-10 мкм, например приблизительно 1-5 мкм. Порошки соединения по изобретению в высокодисперсной форме можно получать способом тонкого измельчения или сходным способом уменьшения размера. Тонкое измельчение можно проводить с использованием струйной мельницы, такой как мельницы, производимые Hosokawa Alpine. Полученное распределение размера частиц можно измерять с использованием лазерной дифракции (например, с использованием устройства Malvern Mastersizer 2000S). Как правило, состав содержит приемлемый для местного применения разбавитель, такой как лактоза, глюкоза или маннит (предпочтительно лактоза), как правило, с большим размером частиц, например MMAD 50 мкм или более, например, 100 мкм или более или  $D_{50}$  40-150 мкм. Как используют в настоящем документе, термин "лактоза" относится к компоненту, содержащему лактозу, включая моногидрат  $\alpha$ -лактозы, моногидрат  $\beta$ -лактозы, безводную  $\alpha$ -лактозу, безводную  $\beta$ -лактозу и аморфную лактозу. Лактозные компоненты можно обрабатывать посредством тонкого измельчения, просеивания, толчения, прессования, гранулирования или сушки распылением. Также включены коммерчески доступные формы лактозы в различных формах, например продукты Lactohale® (лактоза качества для ингаляции; DFE Pharma), InhaLac®70 (просеянная лактоза для порошкового ингалятора; Meggle), Pharmatose® (DFE Pharma) и Respitose® (просеянная лактоза качества для ингаляции; DFE Pharma). В одном из вариантов осуществления лактозный компонент выбран из группы, состоящей из моногидрата  $\alpha$ -лактозы, безводной  $\alpha$ -лактозы и аморфной лактозы. Предпочтительно лактоза представляет собой моногидрат  $\alpha$ -лактозы.

Также сухие порошковые составы могут содержать другие эксципиенты, такие как стеарат натрия, стеарат кальция или стеарат магния.

Как правило, сухой порошковый состав доставляют с использованием устройства порошкового ингалятора (DPI). Примеры системы доставки сухих порошков включают SPINHALER, DISKHALER, TURBOHALER, DISKUS и CLICKHALER. Дополнительные примеры систем доставки сухих порошков включают ECLIPSE, NEXT, ROTAHALER, HANDIHALER, AEROLISER, CYCLOHALER, BREEZHALER/NEOHALER, MONODOSE, FLOWCAPS, TWINCAPS, X-CAPS, TURBOSPIN, ELPENHALER, MIATHALER, TWISTHALER, NOVOLIZER, PRESSAIR, ELLIPTA, порошковый ингалятор ORIEL, MICRODOSE, PULVINAL, EASYHALER, ULTRAHALER, TAIFUN, PULMOJET, OMNIHALER, GYROHALER, TAPER, CONIX, XCELOVAIR и PROHALER.

В одном из вариантов осуществления соединение по настоящему изобретению предоставлено в тонкоизмельченном сухом порошковом составе, например, дополнительно содержащем лактозу подходящего качества, необязательно вместе со стеаратом магния, которыми заполняют устройство для однократного дозирования, такое как AEROLISER, или заполняют устройство для многократного дозирования, такое как DISKUS.

Соединение по настоящему изобретению также можно вводить ректально, например, в форме суппозитория или клизмы, которые содержат водные или масляные растворы, а также суспензии и эмульсии. Такие композиции получают стандартными способами, хорошо известными специалистами в данной области. Например, суппозитории можно получать, смешивая активный ингредиент с общепринятой основой для суппозитория, такой как масло какао или другие глицериды, например Suppocire. В этом случае лекарственное средство смешивают с подходящим нераздражающим эксципиентом, который является твердым при обычной температуре, но жидким при ректальной температуре и, таким образом, расплавляется в прямой кишке с высвобождением лекарственного средства. Такие материалы представляют собой масло какао и полиэтиленгликоли.

Как правило, для композиций, предназначенных для местного введения в глаза в форме глазных капель или глазных мазей общее количество ингибитора составляет приблизительно от 0,0001 до менее 4,0% (мас./мас.).

Для местного введения в глаза композиции, вводимые по настоящему изобретению, предпочтительно формулировать в виде растворов, суспензий, эмульсий и других лекарственных форм. Как правило, предпочтительны водные растворы на основе простого состава, а также возможности пациенту легко вводить такие композиции посредством закапывания одной-двух капель растворов в пораженные глаза. Однако композиции также могут представлять собой суспензии, густые или полугустые гели или другие типы твердых или полутвердых композиций. Суспензии могут являться предпочтительными для соединений, которые плохо растворимы в воде.

Композиции, вводимые по настоящему изобретению, также могут содержать различные другие ингредиенты, включая в качестве неограничивающих примеров, средства придания тоничности, буферы, поверхностно-активные вещества, стабилизирующие полимеры, консерванты, вспомогательные растворители и средства обеспечения вязкости. Предпочтительные фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат ингибитор со средством придания тоничности и буфером. Дополнительно фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут необязательно содержать поверхностно-активное вещество и/или паллиативное средство и/или стабилизирующий полимер.

Для глазных композиций для регуляции тоничности композиции, предпочтительно до тоничности природных слез, можно использовать различные средства придания тоничности. Например, в композицию для аппроксимации физиологической тоничности можно добавлять хлорид натрия, хлорид калия, хлорид магния, хлорид кальция, простые сахара, такие как декстроза, фруктоза, галактоза, и/или простые полиолы, такие как сахарные спирты маннит, сорбит, ксилит, лактит, изомальтит, мальтит, и гидрогенизированные гидролизаты крахмала. Конкретное количество средства придания тоничности варьирует в зависимости от конкретного добавляемого средства. Однако, как правило, композиции содержат средство придания тоничности в количестве, достаточном для обеспечения конечной композиции офтальмически приемлемой осмоляльности (как правило, приблизительно 150-450 мОсм, предпочтительно 250-350 мОсм, а наиболее предпочтительно приблизительно 290 мОсм). Как правило, средства придания тоничности по изобретению присутствуют в диапазоне от 2 до 5% мас./мас., (например, от 2 до 4% мас./мас.). Предпочтительные средства придания тоничности по изобретению включают простые сахара или сахарные спирты, такие как D-маннит.

Для предотвращения изменения pH в условиях хранения в композиции можно добавлять подходящую буферную систему (например, фосфат натрия, ацетат натрия, цитрат натрия, борат натрия или борную кислоту). Конкретная концентрация варьирует в зависимости от применяемого средства. Однако предпочтительно буфер выбирают так, чтобы поддерживать заданный pH в диапазоне pH от 5 до 8, а более предпочтительно заданный pH от 5 до 7 или заданный pH от 6,5 до 7,6.

Для доставки более высоких концентраций ингибитора необязательно можно использовать поверхностно-активные вещества. Поверхностно-активные вещества функционируют для растворения ингибитора и стабилизации коллоидной дисперсии, такой как мицеллярный раствор, микроэмульсия, эмульсия и суспензия. Примеры поверхностно-активных веществ, которые необязательно можно использовать, включают полисорбат, полоксамер, полиоксил 40 стеарат, полиоксилкасторовое масло, тилоксапол, тритон и монолаурат сорбитана. Предпочтительные поверхностно-активные вещества для применения по изобретению обладают гидрофильно-липофильным балансом "HLB" в диапазоне от 12,4 до 13,2 и приемлемы для офтальмологического применения, например тритон X114 и тилоксапол.

Например, состав 4-((4-((4-(3-(5-(трет-бутил)-2-метокси-3-(метилсульфонамидо)фенил)уреидо)нафталин-1-ил)окси)пиридин-2-ил)амино)-2-метоксибензойной кислоты или ее фармацевтически приемлемых соли, сольвата или изотопного производного для местного введения в глаза может содержать:

- (a) воду;
- (b) поверхностно-активное вещество (например, полиоксил 40 стеарат);
- (c) средство придания тоничности (например, маннит); и
- (d) подходящую буферную систему (например, фосфатный буфер, содержащий смесь одноосновного дигидрофосфата и двухосновного гидрофосфата), выбираемую для поддержания заданного pH в диапазоне от 6,5 до 8.

В таких местных глазных составах можно использовать одно или несколько (например, все) из следующего:

- (i) 4-((4-((4-(3-(5-(трет-бутил)-2-метокси-3-(метилсульфонамидо)фенил)уреидо)нафталин-1-ил)окси)пиридин-2-ил)амино)-2-метоксибензойная кислота присутствует в концентрации в диапазоне от 0,001 до 20 мг/мл (например, от 0,01 до 10 мг/мл, от 0,1 до 2 мг/мл или, в частности, 1 мг/мл);
- (ii) поверхностно-активное вещество (например, полиоксил 40 стеарат) присутствует от 1 до 10% мас./мас. (например, от 2 до 5% мас./мас., например от 2,5 до 4% мас./мас., или, в частности, 3% мас./мас.);
- (iii) средство придания тоничности (например, маннит) присутствует от 1 до 15% мас./мас. (например, от 2 до 10% мас./мас., например от 3 до 6% мас./мас., или, в частности, 4,5% мас./мас.);
- (iv) буферная система, используемая в качестве компонента состава, представляет собой водный фосфатный буфер (например, 10 mM водный фосфатный буфер), выбираемый для поддержания заданного pH в диапазоне от 6,5 до 8,0 (например, в диапазоне от 7,0 до 7,8 или, в частности, от 7,2 до 7,6).

Дополнительные средства, которые можно добавлять в офтальмологические композиции по настоящему изобретению, представляют собой смягчающие средства, которые функционируют в качестве стабилизирующего полимера. Стабилизирующий полимер должен представлять собой ионный/заряженный полимер с преимущественным местным применением в глаза, более конкретно, полимер, который несет отрицательный заряд на своей поверхности, которая может демонстрировать дзета-потенциал (-)10-50 мВ для физической стабильности, и способный формировать дисперсию в воде (т.е. является водорастворимым). Предпочтительный стабилизирующий полимер по изобретению может представлять собой полиэлектролит или полиэлектролиты, если их более одного, из семейства поперечно сшитых полиакрилатов, таких как карбомеры, поликарбофил и Remulen(R), конкретно карбомер 974p (полиакриловая кислота), при 0,1-0,5% мас./мас.

Для увеличения вязкости носителя в офтальмологические композиции по настоящему изобретению также можно добавлять другие соединения. Примеры увеличивающих вязкость средств в качестве неограничивающих примеров включают полисахариды, такие как гиалуроновая кислота и ее соли, хондроитинсульфат и его соли, декстраны, различные полимеры семейства целлюлоза, виниловые полимеры и



d)пиримидин-4-ил]-1H-пиразол-1-ил]-3-азетидинацетонитрил), филготиниб (N-[5-[4-[(1,1-диоксо-1,4-тиазинан-4-ил)метил]фенил]-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиридин-2-ил]циклопропанкарбоксамид), пефицитиниб (4-(((1R,2r,3S,5s,7s)-5-гидроксиадамтан-2-ил)амино)-1H-пирроло[2,3-b]пиридин-5-карбоксамид) или R348 (см., например, US 2014/0206708));

ингибиторы STAT3 (например, TAK-114; (3E)-1-метил-3-(2-оксо-1H-индол-3-илиден)индол-2-он);  
ингибиторы взаимодействующей с рецепторами протеинкиназы-1 (RIP1) (например, GSK2982772);  
ингибиторы Syk и их пролекарственные средства (например, фостаматиниб и R-406);  
ингибиторы фосфодиэстеразы-4 (например, тетомиласт);  
HMPL-004;  
пробиотики;  
модуляторы микробиома (например, SGM1019);  
дерсалазин;  
семапимод/CPSI-2364;  
ингибиторы протеинкиназы C (например, AEB-071),

(например, для лечения нарушений желудочно-кишечного тракта (таких как болезнь Крона или язвенный колит) другое терапевтическое средство может представлять собой, например, одно или несколько средств, выбранных из списка, содержащего

5-аминосалициловую кислоту или ее пролекарственное средство (такое как сульфасалазин, олсалазин или балсалазид);

кортикостероиды (например, преднизолон, метилпреднизолон или будезонид);  
иммуносупрессоры (например, циклоспорин, такролимус, метотрексат, азатиоприн или 6-меркаптопурин);  
антитела к TNF $\alpha$  (например, инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб пегол или голимумаб);  
антитела к IL12/IL23 (например, устекинумаб) или низкомолекулярные ингибиторы IL12/IL23 (например, апилимод);

антитела к  $\alpha 4\beta 7$  (например, ведолизумаб);  
блокаторы MAdCAM-1 (например, PF-00547659);  
антитела к молекуле клеточной адгезии  $\alpha 4$ -интегрину (например, натализумаб);  
антитела к  $\alpha$ -субъединице рецептора IL2 (например, даклизумаб или базиликсимаб);  
ингибиторы JAK3 (например, тофацитиниб или R348);  
ингибиторы Syk и их пролекарственные средства (например, фостаматиниб и R-406);  
ингибиторы фосфодиэстеразы-4 (например, тетомиласт);  
HMPL-004;  
пробиотики;  
дерсалазин;  
семапимод/CPSI-2364; и  
ингибиторы протеинкиназы C (например, AEB-071)).

Для лечения глазных нарушений (таких как увеит и сухой кератоконъюнктивит (синдром сухих глаз)) другое терапевтическое средство может представлять собой, например, одно или несколько средств, выбранных из списка, содержащего

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

агонисты глюкокортикоидов (например, мапракорат);  
иммуносупрессоры (например, циклоспорин, воклоспорин, азатиоприн, метотрексат, мофетил-микофенолата или такролимус);  
антитела к TNF $\alpha$  (например, инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб пегол, ESBA-105 или голимумаб);

антитела к IL-17A (например, секукинумаб);  
ингибиторы mTOR (например, сиролимус);  
VGX-1027;  
агонисты рецепторов аденозина A<sub>3</sub> (например, CF-101);  
лифитеграт;  
блокаторы IL1 (например, EBI-005; Hou et al. PNAS 2013, 110(10), 3913-3918);  
RGN-259 (тимозин  $\beta 4$ );  
SI-614;  
OTX-101;  
ингибиторы JNK (например, XG-104);  
ингибиторы передачи сигнала MAP-киназ (например, DA-6034; {[2-(3,4-диметоксифенил)-5-метокси-4-оксохромен-7-ил]окси}уксусная кислота);  
стимуляторы муцина (например, ребамипид; 2-[(4-хлорбензоил)амино]-3-(2-оксо-1H-хинолин-4-ил)пропионовая кислота);  
MIM-D3 (тавилермид; см., например, US 2013/0345395);

ингибиторы JAK (например, тофацитиниб, барицитиниб (1-(этилсульфонил)-3-[4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил]-3-азетидинацетонитрил), филготиниб (N-[5-[4-[(1,1-диоксо-1,4-тиазинан-4-ил)метил]фенил]-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиридин-2-ил]циклопропанкарбоксамид), пефицитиниб (4-(((1R,2r,3S,5s,7s)-5-гидроксиадамтан-2-ил)амино)-1Н-пирроло[2,3-b]пиридин-5-карбоксамид) или R348 (см., например, US 2014/0206708)) и

ингибиторы протеинкиназы C (например, АЕВ-071),

(например, для лечения глазных нарушений (таких как увеит и сухой кератоконъюнктивит (синдром сухих глаз)) другое терапевтическое средство может представлять собой, например, одно или несколько средств, выбранных из списка, содержащего

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

агонисты глюкокортикоидов (например, мапракорат);

иммуносупрессоры (например, циклоспорин, воклоспорин, азатиоприн, метотрексат, мофетил микрофенолата или такролимус);

антитела к TNF $\alpha$  (например, инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб пегол, ESBA-105 или голимумаб);

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

ингибиторы mTOR (например, сиролимус);

VGX-1027;

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

лифитеграт;

JAK3 ингибиторы (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 (синдром сухих глаз)) другое терапевтическое средство может представлять собой, например, одно или несколько средств, выбранных из списка, содержащего

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

иммуносупрессоры (например, циклоспорин, воклоспорин, азатиоприн, метотрексат, мофетил микрофенолата или такролимус);

антитела к TNF $\alpha$  (например, инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб пегол, ESBA-105 или голимумаб);

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

ингибиторы mTOR (например, сиролимус);

VGX-1027;

ингибиторы JAK (например, тофацитиниб, барицитиниб, филготиниб, пефицитиниб или R348) (например, JAK3 ингибиторы, такие как тофацитиниб или R348) и ингибиторы протеинкиназы C (например, АЕВ-071).

Применения в медицине.

Соединение по изобретению можно использовать в качестве монотерапии воспалительных заболеваний или в способах комбинированного лечения таких заболеваний.

Таким образом, варианты осуществления аспектов (е)-(g) выше, которые можно указать, включают варианты осуществления, в которых соединение формулы I (или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или изотопное производное) является единственным фармакологически активным ингредиентом, используемым при лечении.

Однако в других вариантах осуществления аспектов (е)-(g) выше соединение формулы I (или его фармацевтически приемлемые соль, сольват или изотопное производное) вводят индивидууму, которому также вводят одно или несколько других терапевтических средств (например, где одно или несколько других терапевтических средств являются такими, как определено выше в отношении комбинированных продуктов).

При использовании в настоящем документе термин "воспалительное заболевание" конкретно включает указание на одно или несколько из следующих:

(i) заболевания или нарушения легких с воспалительным компонентом, такие как муковисцидоз (кистозный фиброз), легочная гипертензия, саркоидоз легких, идиопатический легочный фиброз или, в частности, COPD (включая хронический бронхит и эмфизему), астма или астма детей;

(ii) кожные заболевания или нарушения с воспалительным компонентом, такие как атопический дерматит, аллергический дерматит, контактный дерматит или псориаз;

(iii) заболевания или нарушения носа с воспалительным компонентом, такие как аллергический ринит, ринит или синусит;

(iv) глазные заболевания или нарушения с воспалительным компонентом, такие как конъюнктивит, аллергический конъюнктивит, глаукома, диабетическая ретинопатия, отек желтого пятна (включая диабетический отек желтого пятна), окклюзия центральной вены сетчатки (CRVO), сухая и/или влажная

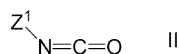
формы возрастной дегенерации желтого пятна (AMD), послеоперационное воспаление при катаракте или, в частности, сухой кератоконъюнктивит (синдром сухих глаз, также известный как ксерофтальмия), увеит (включая передний, задний и панувеит), трансплантат роговицы и отторжение трансплантата лимбальных клеток; и

(v) заболевания или нарушения желудочно-кишечного тракта с воспалительным компонентом, такие как глютензависимая энтеропатия (целиакия), эозинофильный эзофагит, кишечная реакция "трансплантат против хозяина" или, в частности, болезнь Крона или язвенный колит.

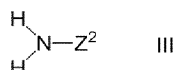
Указания в настоящем документе на заболевания с воспалительным компонентом включают указания на заболевания, в которые вовлечено воспаление, вне зависимости от того есть ли или нет другие (невоспалительные) симптомы или следствия заболевания.

По дополнительному аспекту изобретения предоставлен способ получения соединения формулы I, где способ включает:

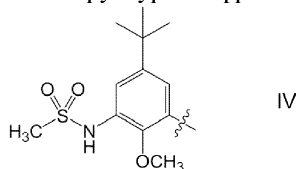
(a) реакцию соединения формулы II



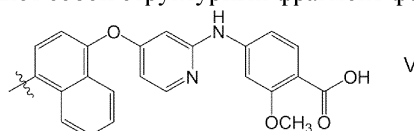
с соединением формулы III



где один из  $\text{Z}^1$  и  $\text{Z}^2$  представляет собой структурный фрагмент формулы IV

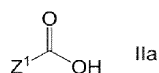


а другой из  $\text{Z}^1$  и  $\text{Z}^2$  представляет собой структурный фрагмент формулы V



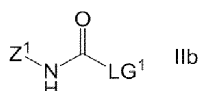
например, в условиях, известных специалистам в данной области, таких как при температуре от температуры окружающей среды (например, от 15 до 30°C) до приблизительно 110°C в присутствии подходящего органического растворителя (например, полярного апротонного растворителя, такого как DMF, THF, 1,4-диоксан или их смеси);

(b) реакцию соединения формулы IIa



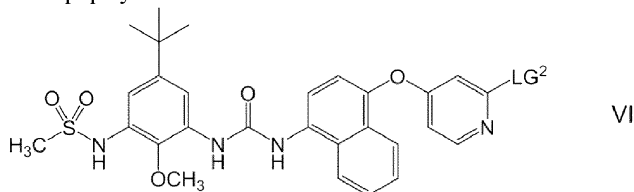
где  $\text{Z}^1$  является таким, как определено выше, с подходящим формирующим азиды средством (т.е. подходящим источником уходящей группы и активированного азидного иона, таким как дифенилфосфорилизид; см., например, Tetrahedron 1974, 30, 2151-2157) в условиях, известных специалистам в данной области, таких как от температуры ниже окружающей среды до температуры окружающей среды (например, от исходной температуры приблизительно от -5 до 5°C до температуры окружающей среды после реакции) в присутствии аминового основания (например, триэтиламина или стерически пространственно-затрудненного основания, такого как N,N-диизопропилэтиламин) и подходящего органического растворителя (например, полярного апротонного растворителя, такого как DMF, THF, 1,4-диоксан или их смеси), где за этой реакцией без выделения следует термическая перегруппировка (например, при нагревании) промежуточного ацилазида (формулы  $\text{Z}^1\text{-C}(\text{O})\text{-N}_3$ ), например, при температуре окружающей среды (например, от 15 до 30°C) с получением, *in situ*, соединения формулы II, которое затем подвергают реакции с соединением формулы III, как определено выше, с получением соединения формулы I;

(c) реакцию соединения формулы IIb

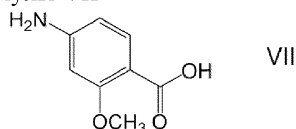


где  $\text{LG}^1$  представляет собой подходящую уходящую группу (например, имидазолил, хлор или арилокси, такую как фенокси), а  $\text{Z}^1$  является таким, как определено выше, с соединением формулы III, как определено выше, например, в условиях, известных специалистам в данной области, таких как при температуре окружающей среды (например, от температуры окружающей среды до 80°C), необязательно в присутствии аминового основания (например, триэтиламина или стерически пространственно-затрудненного основания, такого как N,N-диизопропилэтиламин) и подходящего органического растворителя (например, апротонного растворителя, такого как дихлорметан или сложный эфир, такой как изопропилацетат);

(d) реакцию соединения формулы VI



где LG<sup>2</sup> представляет собой подходящую уходящую группу (например, галогеновую группу, такую как хлор или бром), с соединением формулы VII



например, в условиях, известных специалистам в данной области (например, как описано в J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 15686-15696), таких как при повышенной температуре (например, от 50 до 110°C) в присутствии подходящего органического растворителя (например, полярного апротонного растворителя, такого как DMF, THF, 1,4-диоксан или их смеси) и, необязательно, кислотного катализатора (например, сульфоновой кислоты, такой как паратолуолсульфоновая кислота);

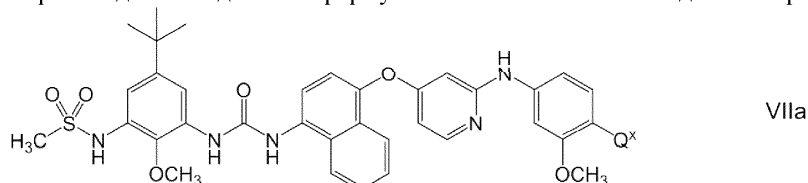
(е) снятие защиты защищенного производного соединения формулы I в условиях, известных специалистам в данной области, где защищенное производное несет защитную группу на атоме O или N соединения формулы I (и, во избежание неоднозначного толкования, защищенное производное одного соединения формулы I может или не может представлять собой другое соединение формулы I).

Примеры защищенных производных соединения формулы I включают защищенные производные, где

атом O защищен бензильной группой, где эту бензильную группу можно удалять посредством гидрирования, например, в присутствии палладиевого катализатора (такого как Pd/C);

атом O карбоновой кислоты защищен алкильной группой (такой как метил, этил или трет-бутил), где эту алкильную группу можно удалять посредством основного гидролиза (например, для метильной или этильной групп, посредством реакции гидролиза с использованием гидроксида щелочного металла, такого как гидроксид натрия) или кислотного гидролиза (например, для трет-бутильной группы, посредством реакции гидролиза с использованием кислоты, такой как трифторуксусная кислота).

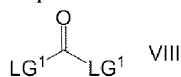
Защищенные производные соединения формулы I также включают соединения формулы VIIa



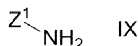
где Q<sup>x</sup> представляет собой -C(O)OR<sup>4</sup>, а R<sup>4</sup> представляет собой C<sub>1-4</sub>алкильную группу (например, C<sub>4</sub>-алкильную группу или C<sub>1-3</sub>алкильную группу, такую как метил).

Соединения формулы II можно получать способами или аналогично способам, известным специалистам в данной области, например посредством реакции соединения формулы IIa, как определено выше, с формирующим азидами средством, с последующей перегруппировкой промежуточного ацилазида (как описано в (b) выше; см., например, Tetrahedron 1974, 30, 2151-2157).

Соединения формулы IIb можно получать реакцией соединения формулы VIII



где LG<sup>1</sup> является таким, как определено выше в настоящем документе, с соединением формулы IX



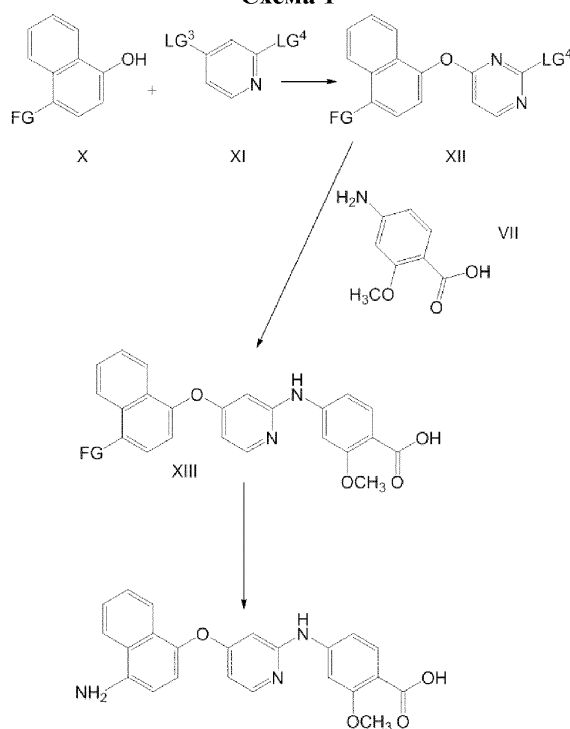
где Z<sup>1</sup> является таким, как определено выше в настоящем документе, например, в условиях, известных специалистам в данной области.

Амины формулы IX можно получать из карбоновой кислоты формулы IIa способом, описанным в (b) выше, где промежуточный изоцианат II гидролизуют водой с получением карбаминовой кислоты, которая теряет диоксид углерода с получением IX. Подобным образом промежуточный изоцианат II можно подвергать реакции со спиртом, таким как трет-бутанол, с получением защищенного варианта IX.

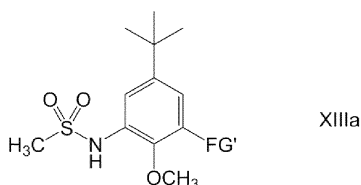
Соединение формулы III, в котором Z<sup>2</sup> представляет собой структурный фрагмент формулы V, или соединение формулы IX, в котором Z<sup>1</sup> представляет собой структурный фрагмент формулы V, можно синтезировать способом, приведенным на схеме 1 (см., например: WO 2003/072569 и WO 2008/046216), где LG<sup>3</sup> и LG<sup>4</sup> представляют собой уходящие группы, например галоген или метансульфонил, а FG пред-

ставляет собой фактическую или неявную группу  $\text{NH}_2$ , т.е. группу, которая легко трансформируется в группу  $\text{NH}_2$ , такую как нитро или защищенный  $\text{NH-PG}^2$ , где  $\text{PG}^2$  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 сложный карбаматный эфир или карбоксамид. Последовательность начинается с опосредуемого основанием замещения  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$   $\text{LG}^3$  в XI посредством ароксидов, формируемых, когда X обрабатывают основанием с получением простых эфиров XII. Затем оставшийся галоген или метансульфонильный заместитель ( $\text{LG}^4$ ) простого эфира XII затем замещают (i) амином формулы VII во второй реакции  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$  или (ii) посредством связывания по Бухвальду (см., например, WO 2009/017838) с амином формулы VII с получением желаемого соединения (где FG представляет собой  $\text{NH}_2$ ) или XIII (где FG представляет собой нитро или  $\text{NH-PG}^2$ ). Когда FG в XIII представляет собой нитро, группу  $\text{NH}_2$  можно получать посредством реакции восстановления, как правило, проводимой посредством гидрирования с применением подходящего катализатора, например палладия на углеороде, или в условиях растворения металлов, например с железом в ледяной уксусной кислоте. Альтернативно, когда FG представляет собой защитную группу, группу  $\text{NH}_2$  можно получать посредством реакции снятия защиты. Хотя изображено, что снятие защиты с неявной группы  $\text{NH}_2$ , представленной FG, происходит только на конечном этапе последовательности, следует отметить, что его можно проводить на любом этапе последовательности синтеза, представленной на схеме 1.

Схема 1



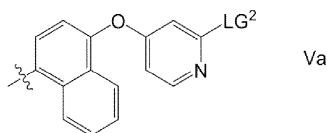
Подобным образом амины формулы IX, в которых  $\text{Z}^1$  представляет собой структурный фрагмент формулы IV, можно синтезировать посредством преобразования неявной группы  $\text{NH}_2$  в реальную группу  $\text{NH}_2$  в соединении формулы XIIIa



где  $\text{FG}'$  является таким, как определено для FG выше, за исключением того, что он не представляет собой  $\text{NH}_2$ .

Соединения формулы VI можно синтезировать по аналогии с соединением формулы I (см., например, альтернативные способы (a)-(c) выше). Например, соединения формулы VI можно получать посредством реакции соединения формулы IIx с соединением формулы IIIx, где определения соединений формул IIx и IIIx являются такими же как у соединений формул II и III, за исключением того, что один из  $\text{Z}^1$  и  $\text{Z}^2$  представляет собой структурный фрагмент формулы IV, как определено выше в настоящем документе, а другой из  $\text{Z}^1$  и  $\text{Z}^2$  представляет собой структурный фрагмент формулы Va

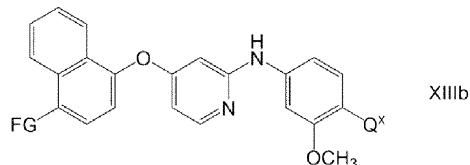




Соединения формулы VIIa можно получать аналогично способам получения соединения формулы I, описываемым в настоящем документе (см., например, способы (a)-(d) и схему 1 выше).

Например, можно заменить группу  $-\text{CO}_2\text{H}$  на  $\text{Q}^x$  в структурном фрагменте формулы V (с получением структурного фрагмента формулы Vp и соответствующих соединений формул IIp, IIa, IIb и IIc, в которых  $\text{Z}^1$  и  $\text{Z}^2$  заменены на  $\text{Z}^{1p}$  и  $\text{Z}^{2p}$ , соответственно, где один из  $\text{Z}^{1p}$  и  $\text{Z}^{2p}$  представляет собой структурный фрагмент формулы IV, как определено выше, а другой из  $\text{Z}^{1p}$  и  $\text{Z}^{2p}$  представляет собой структурный фрагмент формулы Vp); или соединения формулы VII (с получением соединения формулы VIIp).

Альтернативно, соединения формулы VIIa можно получать, преобразуя в соединении формулы XIIIb



группу FG в  $\text{NH}_2$ ,

где FG и  $\text{Q}^x$  являются такими, как определено выше в настоящем документе (например, преобразуя FG в  $\text{NH}_2$ , как описано выше в отношении схемы 1),

с последующей реакцией, например, с соединением формулы IIb, где  $\text{Z}^1$  представляет собой структурный фрагмент формулы IV.

Специалистам в данной области следует понимать, что соединения, представленные формулами II, IIx и IIb, как правило, являются реакционноспособными промежуточными соединениями. Эти промежуточные соединения можно формировать *in situ* и непосредственно, без выделения, подвергать реакции с соединениями формулы III с получением соединения формулы I. Кроме того, специалистам в данной области следует понимать, что в способах, описанных выше для любой из групп  $\text{Z}^1$  и  $\text{Z}^2$ , содержащих химически чувствительные функциональные группы, например гидроксильную группу или аминогруппу, может требоваться применение подходящих защитных групп.

Множество соединений, представленных в схемах, являются коммерчески доступными, или их можно получать излагаемыми способами, или специалисты в данной области могут легко получать их общепринятыми способами. См. например, 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 и WO 2014/027209.

Новые промежуточные соединения, как описано в настоящем документе, формируют один из аспектов изобретения. В этом отношении дополнительные аспекты изобретения относятся к:

(i) соединению формул II, IIa или IIb, как определено выше в настоящем документе, где  $\text{Z}^1$  представляет собой структурный фрагмент формулы V, или к его соли или защищенному производному;

(ii) соединению формулы III, как определено выше в настоящем документе, где  $\text{Z}^2$  представляет собой структурный фрагмент формулы V, или к его соли или защищенному производному;

(iii) соединению формулы VIIa, как определено выше в настоящем документе, или к его соли или защищенному производному; и

(v) соединению формулы XIII или XIIIb, как определено выше в настоящем документе, или к его соли или защищенному производному.

Защищенные производные соединений формул III, VII, XIII и XIIIb включают защищенные производные, в которых ключевая группа  $\text{NH}_2$  (или группа  $\text{NH}_2$ , представленная FG) является защищенной. В этом отношении, такие защищенные производные включают амиды или, в частности, карбаматы этих соединений. Например, эти защищенные производные включают соединения, в которых атом H группы  $\text{NH}_2$  замещен:

$\text{R}'\text{-C(O)-}$ , где  $\text{R}'$  представляет собой H,  $\text{C}_{1-8}$ алкил, фенил или бензил, где последние две группы необязательно являются замещенными одной или несколькими группами, выбранными из галогена, гидрокси, метила и метокси; или

$\text{R}''\text{-O-C(O)-}$ , где  $\text{R}''$  представляет собой трет-бутил, фенил, бензил или флуоренил, где последние две группы необязательно являются замещенными одной или несколькими группами, выбранными из галогена, гидрокси, метила и метокси.

Защищенные производные соединений формул II, IIa, IIb, III, VII и XIII, в которых  $\text{R}^4$  представляет собой  $-\text{CO}_2\text{H}$  дополнительно (или альтернативно) включают защищенные производные, в которых карбоксильная группа является защищенной. В этом отношении такие защищенные производные также включают сложные эфиры (например, сложные  $\text{C}_{1-8}$ алкильные эфиры, такие как этиловый или, особенно, метиловый сложные эфиры) таких соединений.

Специалистам в данной области понятно, что соединения формулы III, в которых  $Z^2$  представляет собой структурный фрагмент формулы V, могут являться защищенными по ключевой группе  $\text{NH}_2$  и/или, когда  $R^4$  представляет собой  $-\text{CO}_2\text{H}$ , по карбоксильной группе. В этом отношении, например, конкретные защищенные производные соединений формулы III, в которых  $Z^2$  представляет собой структурный фрагмент формулы V, которые можно указать, включают

метил-4-((4-((4-аминонафталин-1-ил)окси)пиридин-2-ил)амино)-2-метоксибензоат и метил-4-((4-((4-((трет-бутоксикарбонил)амино)нафталин-1-ил)окси)пиридин-2-ил)амино)-2-метоксибензоат.

Также метил-4-((4-((4-аминонафталин-1-ил)окси)пиридин-2-ил)амино)-2-метоксибензоат и метил-4-((4-((4-((трет-бутоксикарбонил)амино)нафталин-1-ил)окси)пиридин-2-ил)амино)-2-метоксибензоат представляют собой соединения формулы XIIIb (в которой  $Q^x$  представляет собой  $-\text{CO}_2\text{CH}_3$  и, соответственно, FG представляет собой  $\text{NH}_2$  или  $\text{NH-PG}^2$ , в которой  $\text{PG}^2$  представляет собой трет-бутоксикарбонил).

Альтернативные варианты осуществления по изобретению относятся к соединению, которое представляет собой:

(i) защищенное производное соединения формулы III, в котором  $Z^2$  представляет собой структурный фрагмент формулы V; или

(ii) соединение формулы XIIIb или его защищенное производное, при условии, что указанное соединение не представляет собой

метил-4-((4-((4-аминонафталин-1-ил)окси)пиридин-2-ил)амино)-2-метоксибензоат или метил-4-((4-((4-((трет-бутоксикарбонил)амино)нафталин-1-ил)окси)пиридин-2-ил)амино)-2-метоксибензоат.

Дополнительные варианты осуществления изобретения относятся к соединению формулы VIIa, как определено выше в настоящем документе, при условии, что указанное соединение:

(a) представляет собой или

(b) не представляет собой

метил-4-((4-((4-((3-(5-(трет-бутил)-2-метокси-3-(метилсульфонамидо)фенил)уреидо)нафталин-1-ил)окси)пиридин-2-ил)амино)-2-метоксибензоат.

Аспекты изобретения, описываемые в настоящем документе (например, указанные выше соединения, комбинации, способы и применения), могут обладать тем преимуществом, что при лечении патологических состояний, описываемых в настоящем документе, они могут являться более удобными для врача и/или пациента, более эффективными, менее токсичными, обладать большей селективностью, обладать большим диапазоном активности, являться более сильнодействующими, давать меньше побочных эффектов, обладать лучшим фармакокинетическим и/или фармакодинамическим профилем, обладать более подходящей морфологией в твердом состоянии, обладать более длительной стабильностью или обладать другими полезными фармакологическими свойствами, чем сходные соединения, комбинации, способы (лечения) или применения, известные на предшествующем уровне техники для применения при лечении этих патологических состояний или в иных случаях.

Соединение по изобретению может дополнительно (или альтернативно)

демонстрировать длительные действие и/или стойкость действия (например, по сравнению с другими ранее исследованными ингибиторами MAP-киназ p38, например такими как BIRB796);

демонстрировать сильное ингибирование Syk (например, они могут обладать  $\text{IC}_{50}$  против Syk 500 нМ или менее, например 350 нМ или менее);

не сильно ингибировать GSK3 $\alpha$  (например, они могут обладать  $\text{IC}_{50}$  против GSK3 $\alpha$  1000 нМ или более, например, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 или 10000 нМ или более);

воздействовать на меньшую часть киназа, т.е. с улучшенной селективностью, как проиллюстрировано меньшими индексами селективности KINOMEscan;

сохранять относительно высокую локальную концентрацию лекарственного средства в промежутках между дозированием (например, высокую локальную концентрацию относительно других ранее исследованных ингибиторов MAP-киназ p38, например, таких как BIRB796);

демонстрировать свойства, которые особенно подходят для местного/локального введения (например, после местного/локального введения обеспечивать высокие концентрации в тканях-мишенях, но низкие плазматические концентрации соединения формулы I, и/или быстрое выведение соединения формулы I из плазмы, например, в результате высокого выведения через почки или печень);

демонстрировать низкие или не демонстрировать индукцию  $\beta$ -катенина и/или ингибирование митоза в клетках;

не обеспечивать увеличение двухъядерных клеток, содержащих микроядра, у лимфоцитов человека в тесте микроядер *in vitro*;

демонстрировать небольшое или демонстрировать отсутствие зависимость от времени ингибирования представителей суперсемейства цитохрома P450;

демонстрировать улучшенную химическую стабильность в присутствии воды (например, стабильность к гидролизу в водных смесях при повышенных температурах) по сравнению с ранее исследован-

ными ингибиторами MAP-киназ p38, например, такими как BIRB796;

повышать после введения пациенту уровень метаболитов, не сильно ассоциированных или не ассоциированных с проблемами с безопасностью (например, с токсичностью);

демонстрировать сниженную способность к раздражению или токсичность для глаз у используемых до клинических испытаний видов и у людей после местного применения;

демонстрировать хорошую растворимость в воде и/или проницаемость клеток;

быть более легко формулируемым в водном растворе в диапазоне pH 7-8 с меньшими количествами способствующих растворению эксципиентов;

обладать более высокой степенью кристалличности; и/или

демонстрировать небольшую или не демонстрировать гигроскопичность в твердом состоянии.

Экспериментальные способы.

Общие способы.

Все исходные вещества и растворители получали из коммерческих источников или получали в соответствии с указаниями в литературе. Если не указано иначе все реакционные смеси перемешивали. Органические растворы стандартным образом сушили над безводным сульфатом магния. Гидрирование проводили в проточном реакторе Thales H-cube в указанных условиях или в атмосфере водорода. Реакции под действием микроволн проводили в микроволновом реакторе CEM Discover and Smithcreator, нагревая до постоянной температуры с использованием микроволнового излучения варьированной мощности.

Хроматографию на колонке с нормальными фазами стандартным образом проводили на автоматизированной системе для флэш-хроматографии, такой как система CombiFlash Companion или CombiFlash RF, с использованием предварительно наполненных диоксидом кремния (230-400 меш, 40-63 мкм) картриджами. SCX приобретали в Supelco и перед применением обрабатывали 1M соляной кислотой. Если не указано иначе, реакционную смесь для очистки сначала разводили MeOH и подкисляли несколькими каплями AcOH. Этот раствор непосредственно наносили на SCX и промывали MeOH. Затем желаемый материал элюировали, промывая 1% NH<sub>3</sub> в MeOH.

Аналитические способы.

Аналитическую ВЭЖХ проводили с использованием колонки Waters Xselect CSH C18, 2,5 мкм, 4,6×30 мм, элюируемой градиентом 0,1% муравьиной кислоты в MeCN в 0,1% водной муравьиной кислоте, или колонки Waters Xbridge BEH C18, 2,5 мкм, 4,6×30 мм, элюируемой градиентом MeCN в водном 10 mM бикарбонате аммония. УФ-спектры элюируемых пиков определяли с использованием диодной матрицы или детектора с переменной длиной волны на системе Agilent 1100.

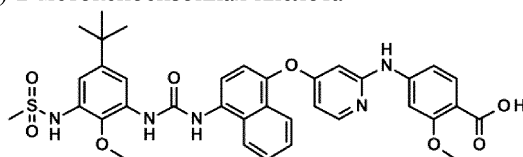
Аналитическую LCMS проводили с использованием колонки Waters Xselect CSH C18, 2,5 мкм, 4,6×30 мм, элюируемой градиентом 0,1% муравьиной кислоты в MeCN в 0,1% водной муравьиной кислоте, или колонки Waters Xbridge BEH C18, 2,5 мкм, 4,6×30 мм, элюируемой градиентом MeCN в водном 10 mM бикарбонате аммония. УФ- и масс-спектры элюируемых пиков измеряли с использованием детектора с переменной длиной волны на масс-спектрометре Agilent 1200 или Agilent Infinity 1260 LCMS с одиночным квадруполом 6120 с электрораспылением положительных и отрицательных ионов.

Препаративную ВЭЖХ проводили с использованием колонки Waters Xselect CSH C18, 5 мкм, 19×50 мм с использованием градиента 0,1% муравьиной кислоты в MeCN в 0,1% водной муравьиной кислоте или градиента MeCN в водном 10 mM бикарбонате аммония или с использованием колонки Waters Xbridge BEH C18, 5 мкм, 19×50 мм с использованием градиента MeCN в водном 10 mM бикарбонате аммония. Фракции собирали после детекции посредством УФ при одной длине волны с измерением детектором с переменной длиной волны на системе для препаративной ВЭЖХ Gilson 215 или системе для препаративной ВЭЖХ Varian PrepStar или посредством массы mass и УФ при одной длине волны с измерением посредством масс-спектрометра с одним квадруполом ZQ, с электрораспылением положительных и отрицательных ионов, и детектора двух длин волн на системе для LCMS Waters FractionLynx.

Спектроскопия <sup>1</sup>H ЯМР. Спектры <sup>1</sup>H ЯМР получали на спектрометре Bruker Avance III при 400 МГц. В качестве стандартов использовали центральные пики хлороформа-d, диметилсульфоксида-d<sub>6</sub> или внутренний стандарт тетраметилсилана.

Получение соединения по изобретению.

Пример 1. 4-((4-((4-(3-(5-(трет-Бутил)-2-метокси-3-(метилсульфонамидо)фенил)уреидо)нафталин-1-ил)окси)пиридин-2-ил)амино)-2-метоксибензойная кислота



(i) трет-Бутил-4-((2-хлорпиридин-4-ил)окси)нафталин-1-ил)карбамат.

Способ 1. Смесь 4-((2-хлорпиридин-4-ил)окси)нафталин-1-амин (см., например, Ito K. et al., WO 2010/112936, 07 Oct 2010; 1000 мг, 3,69 ммоль) и ди-трет-бутилдикарбоната (750 мг, 3,44 ммоль) в

трет-БуОН (10 мл) перемешивали при кипячении с обратным холодильником в течение 18 ч. Смесь разбавляли водой (15 мл) и твердое вещество собирали посредством фильтрования. Твердое вещество растирали в простом диэтиловом эфире с получением указанного в подзаголовке соединения (1002 мг) в виде светло-серого твердого вещества.

$^1\text{H}$  ЯМР (DMSO- $d_6$ ) 400 МГц,  $\delta$ : 9,37 (с, 1H), 8,28 (д, 1H), 8,16 (д, 1H), 8,82 (дд, 1H), 7,66 (д, 1H), 7,66-7,54 (м, 2H), 7,40 (д, 1H), 7,03 (д, 1H), 6,91 (дд, 1H), 1,52 (с, 9H).

Масса/заряд при LCMS 371 (M+H) $^+$  (ES $^+$ ); 369 (M-H) $^-$  (ES $^-$ ).

Способ 2. В смесь трет-бутил-(4-гидроксинафталин-1-ил)карбамата (85 г, 328 ммоль) и Cs $_2$ CO $_3$  (139 г, 426 ммоль) в DMSO (600 мл) добавляли 2-хлор-4-фторпиридин (33 мл, 365 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Добавляли воду (1 л), смесь перемешивали в течение 1 ч, затем осадок отфильтровывали. Реакцию повторяли в масштабе дополнительных 85 г нафтола. Комбинированные осадки промывали водой (2 л), простым эфиром (4×400 мл) и сушили при пониженном давлении при 70°C в течение 72 ч с получением указанного в подзаголовке соединения (201,6 г) в виде светло-серого твердого вещества.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,38 (с, 1H), 8,28 (д, 1H), 8,16 (д, 1H), 7,82 (д, 1H), 7,67-7,56 (м, 3H), 7,40 (д, 1H), 7,03 (д, 1H), 6,92 (дд, 1H), 1,52 (с, 9H).

Масса/заряд при LCMS 371 (M+H) $^+$  (ES $^+$ ); 369 (M-H) $^-$  (ES $^-$ ).

(ii) Метил-4-((4-((трет-бутоксикарбонил)амино)нафталин-1-ил)окси)пиридин-2-ил)амино)-2-метоксибензоат.

Способ 1.

Суспензию продукта после этапа (i) выше (2,0 г, 5,39 ммоль), метил-4-амино-2-метоксибензоат (1,0 г, 5,52 ммоль), BINAP (300 мг, 0,482 ммоль) и карбонат цезия (3,5 г, 10,74 ммоль) в 1,4-диоксане (30 мл) дегазировали азотом в течение 10 мин. Добавляли Pd $_2$ dba $_3$  (200 мг, 0,218 ммоль) и смесь нагревали при 90°C в течение ночи. Смесь разбавляли простым диэтиловым эфиром (60 мл) и фильтровали. Затем фильтрат промывали водой (2×100 мл) и насыщенным соевым раствором (50 мл). Органическую фазу сушили (MgSO $_4$ ), фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта в виде красной пены. Неочищенный продукт очищали посредством хроматографии на устройстве Compaion (колонка 80 г, 20-50% EtOAc в гексане) с получением указанного в подзаголовке соединения (2,34 г) в виде желтой пены.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 9,38 (с, 1H), 9,36 (с, 1H), 8,18 (д, 1H), 8,14 (д, 1H), 7,83 (д, 1H), 7,54-7,66 (м, 5H), 7,37 (д, 1H), 7,22 (дд, 1H), 6,69 (дд, 1H), 6,15 (д, 1H), 3,74 (с, 3H), 3,71 (с, 3H), 1,53 (с, 9H).

Масса/заряд при LCMS 516 (M+H) $^+$  (ES $^+$ ).

Способ 2. Смесь метил-4-амино-2-метоксибензоата (10,8 г, 59,6 ммоль), продукта после этапа (i) выше (20,09 г, 54,2 ммоль) и карбоната калия (15 г, 109 ммоль) в DMF (300 мл) дегазировали N $_2$  в течение 10 мин. Добавляли предкатализатор BrettPhos G3 (1 г, 1,103 ммоль) и смесь нагревали при 85°C в течение 3 ч. Смесь охлаждали, затем разделяли между DCM (500 мл) и водой (800 мл). Органический слой промывали водой (500 мл), сушили (MgSO $_4$ ), фильтровали и выпаривали при пониженном давлении. Остаток растирали в простом эфире, фильтровали и сушили с получением указанного в подзаголовке соединения (21,7 г) в виде серого твердого вещества.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,38 (с, 1H), 9,36 (с, 1H), 8,18 (д, 1H), 8,14 (д, 1H), 7,83 (д, 1H), 7,54-7,66 (м, 5H), 7,38 (д, 1H), 7,22 (дд, 1H), 6,69 (дд, 1H), 6,14 (д, 1H), 3,74 (с, 3H), 3,71 (с, 3H), 1,53 (с, 9H).

Масса/заряд при LCMS 516 (M+H) $^+$  (ES $^+$ ).

(iii) Метил-4-((4-((4-аминонафталин-1-ил)окси)пиридин-2-ил)амино)-2-метоксибензоат в раствор продукта после этапа (ii) выше (2,34 г, 4,08 ммоль) в DCM (50 мл) добавляли TFA (7 мл, 91 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч. Растворители выпаривали и остаток разделяли между насыщенным раствором NaHCO $_3$  (100 мл) и DCM (60 мл). Органическую фракцию отделяли, сушили (MgSO $_4$ ), фильтровали и растворитель выпаривали с получением указанного в подзаголовке соединения (1,5 г) в виде светло-коричневой пены.

Масса/заряд при LCMS 416 (M+H) $^+$  (ES $^+$ ).

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

К перемешиваемому раствору N-(3-амино-5-(трет-бутил)-2-метоксифенил)метансульфонамида (см., например, Cirillo P.F. et al., WO 2002/083628, 24 октября 2002 года; 1,5 г, 5,51 ммоль) и NaHCO $_3$  (1,0 г, 11,90 ммоль) в THF (15 мл) и DCM (15 мл) добавляли фенилхлорформат (0,750 мл, 5,98 ммоль) и смесь перемешивали в течение 2 ч. Смесь промывали водой (20 мл) и органический слой отделяли, сушили (MgSO $_4$ ), фильтровали и выпаривали до коричневой пены, которую перемешивали в циклогексане (20 мл) с получением указанного в подзаголовке соединения (2,05 г) в виде бесцветного твердого вещества.

Масса/заряд при LCMS 393 (M+H) $^+$  (ES $^+$ ); 391 (M-H) $^-$  (ES $^-$ ).

(v) Метил-4-((4-((3-(5-(трет-бутил)-2-метокси-3-(метилсульфонамидо)фенил)уреидо)нафталин-1-ил)окси)пиридин-2-ил)амино)-2-метоксибензоат.

Способ 1. К раствору продукта после этапа (iv) выше (300 мг, 0,764 ммоль) и продукта после этапа (ii) выше (300 мг, 0,722 ммоль) в iPrOAc (15 мл) при 65°C (температура блока) добавляли триэтиламин

(20 мкл, 0,143 ммоль) и смесь перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали при пониженном давлении с получением светло-коричневой пены. Пена суспендировали в Et<sub>2</sub>O (10 мл) в течение 2 ч и полученное твердое вещество собирали посредством фильтрования, промывали дополнительными порциями Et<sub>2</sub>O с получением указанного в подзаголовке соединения (433 мг) в виде бледно-розового твердого вещества.

Масса/заряд при LCMS 358 (M+2H)<sup>2+</sup> (ES<sup>+</sup>).

Способ 2. К раствору продукта после этапа (iv) выше (9,0 г, 22,93 ммоль) и продукта после этапа (iii) выше (9,0 г, 21,66 ммоль) в iPrOAc (300 мл) при 65°C (температура блока) добавляли триэтиламин (600 мкл, 4,30 ммоль) и смесь перемешивали в течение 24 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали при пониженном давлении с получением коричневой пены. Неочищенный продукт очищали посредством хроматографии на устройстве Compaqion (колонка 330 г, 1-5% MeOH в DCM) с получением указанного в подзаголовке соединения (13,2 г) в виде бледно-розового твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 9,40 (с, 1H), 9,35 (с, 1H), 9,16 (с, 1H), 8,93 (с, 1H), 8,31 (д, 1H), 8,17-8,20 (м, 2H), 8,13 (д, 1H), 7,87 (д, 1H), 7,69-7,73 (м, 1H), 7,60-7,63 (м, 2H), 7,53 (д, 1H), 7,41 (д, 1H), 7,24 (дд, 1H), 7,03 (д, 1H), 6,69 (дд, 1H), 6,17 (д, 1H), 3,81 (с, 3H), 3,74 (с, 3H), 3,71 (с, 3H), 3,10 (с, 3H), 1,27 (с, 9H).

Масса/заряд при LCMS 714 (M+H)<sup>+</sup> (ES<sup>+</sup>).

(vi) 4-((4-((3-(5-(трет-Бутил)-2-метокси-3-(метилсульфонамидо)фенил)уреидо)нафталин-1-ил)окси)пиридин-2-ил)амино)-2-метоксибензойная кислота.

Способ 1. К раствору продукта после этапа (v) выше (433 мг, 0,540 ммоль) в THF (2 мл) и метаноле (1 мл) добавляли водный раствор моногидрата гидроксида лития (25 мг, 0,596 ммоль) в воде (3 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Добавляли моногидрат гидроксида лития (25 мг, 0,596 ммоль) и перемешивание продолжали в течение дополнительных 3 суток. Смесь концентрировали при пониженном давлении с удалением THF и метанола, затем разбавляли водой (25 мл). Добавляли раствор моногидрата лимонной кислоты (250 мг, 1,190 ммоль) в воде (5 мл) и полученный осадок собирали посредством фильтрования с получением указанного в заголовке соединения (360 мг) в виде бледно-розового твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11,96 (ушир. с, 1H), 9,39 (с, 1H), 9,31 (с, 1H), 9,14 (с, 1H), 8,91 (с, 1H), 8,30 (д, 1H), 8,19 (д, 1H), 8,18 (д, 1H), 8,12 (д, 1H), 7,87 (д, 1H), 7,71 (дд, 1H), 7,63 (д, 1H), 7,61 (дд, 1H), 7,51 (д, 1H), 7,40 (д, 1H), 7,22 (дд, 1H), 7,02 (д, 1H), 6,68 (дд, 1H), 6,16 (д, 1H), 3,81 (с, 3H), 3,75 (с, 3H), 3,10 (с, 3H), 1,27 (с, 9H). Чистота 90%.

Масса/заряд при LCMS 700 (M+H)<sup>+</sup> (ES<sup>+</sup>).

Способ 2.

К перемешиваемому раствору продукта после этапа (v) выше (33,4 г, 45,9 ммоль) в THF (300 мл) добавляли NaOH (6M aq.) (85,0 мл, 510 ммоль). Добавляли MeOH (60 мл) и перемешивание продолжали в течение 28 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением желтого твердого вещества.

Материал суспендировали в воде (200 мл) и подкисляли 6M HCl (100 мл), получая в осадке белое твердое вещество. Твердое вещество собирали посредством фильтрования, промывали водой. Полученное твердое вещество сушили на фритте в течение 1 ч, затем дополнительно сушили при 40°C при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения в виде гидрохлорида в виде белого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (гидрохлорида; 400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 9,80 (с, 1H), 9,59 (с, 1H), 9,15 (с, 1H), 9,02 (с, 1H), 8,37 (д, 1H), 8,13-8,18 (м, 3H), 7,86 (д, 1H), 7,70-7,74 (м, 1H), 7,62-7,66 (м, 2H), 7,44 (д, 1H), 7,35 (с, 1H), 7,10 (д, 1H), 7,03 (д, 1H), 6,78 (д, 1H), 6,26 (д, 1H), 3,81 (с, 3H), 3,75 (с, 3H), 3,10 (с, 3H), 1,27 (с, 9H).

Масса/заряд при LCMS 700 (M+H)<sup>+</sup> (ES<sup>+</sup>).

Гидрохлорид партиями по 2,0 г, растворенными в THF, наносили на предварительно кондиционированный картридж смолы SCX (20 г смолы, кондиционированной в MeCN). Смолу промывали MeCN, затем продукт высвобождали в 1% NH<sub>3</sub> в MeOH. Фракции NH<sub>3</sub> комбинировали и концентрировали при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения (30 г) в виде свободной кислоты в виде бледно-розового твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (свободной кислоты; 400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 9,56 (с, 1H), 9,28 (с, 1H), 9,00 (с, 1H), 8,34 (д, 1H), 8,16-8,17 (м, 2H), 8,11 (д, 1H), 7,86 (д, 1H), 7,69-7,71 (м, 1H), 7,57-7,63 (м, 2H), 7,48 (д, 1H), 7,40 (д, 1H), 7,21 (дд, 1H), 7,03 (д, 1H), 6,66 (дд, 1H), 6,16 (д, 1H), 3,81 (с, 3H), 3,73 (с, 3H), 3,09 (с, 3H), 1,27 (с, 9H).

Масса/заряд при LCMS 700 (M+H)<sup>+</sup> (ES<sup>+</sup>).

Свободную кислоту (1,0 г, 1,386 ммоль) суспендировали в водном растворе NaOH (0,057 г, 1,414 ммоль) в воде (25 мл). Добавляли MeOH (5 мл) и смесь перемешивали до достижения гомогенности. Полученный раствор разбавляли MeOH (20 мл) и концентрировали при пониженном давлении с получением светло-серого твердого вещества. Материал суспендировали в MeCN (5 мл), в который добавляли воду (0,5 мл) и суспензию перемешивали в течение выходных. Суспензию фильтровали и получен-

ное твердое вещество промывали MeCN (2×3 мл) и сушили в вакууме при 50°C с получением указанного в заголовке соединения в виде натриевой соли (940 мг) в виде белого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (натриевой соли; 400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 9,68 (с, 1H), 9,07 (с, 1H), 9,02 (с, 1H), 8,35 (д, 1H), 8,08-8,13 (м, 2H), 8,02 (д, 1H), 7,85 (д, 1H), 7,64-7,68 (м, 1H), 7,57-7,61 (м, 1H), 7,37-7,43 (м, 2H), 7,30 (с, 1H), 7,11 (дд, 1H), 7,03 (д, 1H), 6,61 (дд, 1H), 6,12 (д, 1H), 3,80 (с, 3H), 3,65 (с, 3H), 2,96 (с, 3H), 1,25 (с, 9H).

Масса/заряд при LCMS 700 (M+H)<sup>+</sup> (ES<sup>+</sup>).

Биологическое тестирование: экспериментальные способы.

Анализы связывания ферментов (KINOMEscan).

Активность связывания киназных ферментов соединением, описываемым в настоящем документе, можно определять с использованием патентованного анализа, в котором определяют определяемое активным центром конкурентное связывание с иммобилизованным лигандом (Fabian M.A. et al., *Nature Biotechnol.*, 2005, 23:329-336). Эти анализы можно проводить посредством устройств DiscoverX (ранее Ambit; San Diego, CA). Процент ингибирования, получаемый при инкубации с тестируемым соединением, можно рассчитывать относительно неингибируемого контроля.

Анализы ингибирования ферментов.

Активность ингибирования ферментов соединением, описываемым в настоящем документе, определяют посредством FRET с использованием синтетических пептидов, меченных донорными и акцепторными флуорофорами (Z-LYTE, Invitrogen Ltd., Paisley, UK).

Ингибирование фермента MAPK p38α.

Для определения ингибирования MAPK p38α можно использовать указанные ниже два варианта анализа.

Способ 1. Активность ингибирования изоформы MAPK p38α (MAPK14; Invitrogen) тестируемыми соединениями оценивают непрямым способом посредством определения уровня активации/фосфорилирования расположенной ниже в каскаде молекулы, MAPKAP-K2. Белок MAPK p38α (80 нг/мл, 2,5 мкл) смешивают с тестируемым соединением (2,5 мкл с концентрацией 4, 0,4, 0,04 или 0,004 мкг/мл) в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем добавляют смешанный раствор (2,5 мкл) неактивной мишени p38α, MAPKAP-K2 (Invitrogen, 600 нг/мл) и пептида FRET (8 мкМ; мишень фосфорилирования MAPKAP-K2), затем инициируют киназную реакцию, добавляя АТФ (40 мкМ, 2,5 мкл). Смесь инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. В течение 1 ч добавляют реагент для формирования детектируемого вещества (протеаза, 5 мкл) с последующей детекцией в микропланшетном флуоресцентном спектрофотометре (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific).

Способ 2. В этом способе используют те же этапы, что и в способе 1 выше, но для смешивания с тестируемым соединением (тестируемым при 1, 0,1, 0,01 или 0,001 мкг/мл) используют более высокую концентрацию белка MAPK p38α (2,5 мкл с концентрацией белка 200 нг/мл вместо 2,5 мкл с концентрацией белка 80 нг/мл).

Ингибирование фермента MAPK p38γ.

Активность ингибирования MAPK p38γ (MAPK12; Invitrogen) соединением по изобретению оценивают сходным с описываемым в настоящем документе выше способом. Фермент (800 нг/мл, 2,5 мкл) инкубируют с тестируемым соединением (2,5 мкл с концентрацией 4, 0,4, 0,04 или 0,004 мкг/мл) в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем к смесям ферментов/соединения добавляют пептиды FRET (8 мкМ, 2,5 мкл) и соответствующий раствор АТФ (2,5 мкл, 400 мкМ) и весь раствор инкубируют в течение 1 ч. В течение 1 ч добавляют реагент для формирования детектируемого вещества (протеаза, 5 мкл) с последующей детекцией в микропланшетном флуоресцентном спектрофотометре (Varioskan® Flash, Thermo Scientific).

Ингибирование ферментов c-Src и Syk.

Активность ингибирования ферментов c-Src и Syk (Invitrogen) соединением по изобретению оценивают сходным с описываемым в настоящем документе выше способом. Соответствующий фермент (3000 или 2000 нг/мл, соответственно, 2,5 мкл) инкубируют с тестируемым соединением (1, 0,1, 0,01 или 0,001 мкг/мл, 2,5 мкл каждого) в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем к смесям ферментов/соединения добавляют пептиды FRET (8 мкМ, 2,5 мкл) и соответствующий раствор АТФ (2,5 мкл, 800 мкМ АТФ для c-Src и 60 мкМ АТФ для Syk) и весь раствор инкубируют в течение 1 ч. В течение 1 ч добавляют реагент для формирования детектируемого вещества (протеаза, 5 мкл) с последующей детекцией в микропланшетном флуоресцентном спектрофотометре (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific).

Ингибирование фермента GSK3α.

Для определения ингибирования GSK3α можно использовать два приводимых ниже варианта анализа.

Способ 1. Активность ингибирования изоформы фермента GSK3α (Invitrogen) соединением по изобретению оценивают посредством определения уровня активации/фосфорилирования пептида-мишени. Белок GSK3α (500 нг/мл, 2,5 мкл) смешивают с тестируемым соединением (2,5 мкл при концентрациях 4, 0,4, 0,04 или 0,004 мкг/мл) в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем к смеси фермента/соединения добавляют пептид FRET (8 мкМ, 2,5 мкл), который является мишенью фосфорилирования

GSK3 $\alpha$ , и АТФ (40 мкМ, 2,5 мкл) и полученную смесь инкубируют в течение 1 ч. В течение 1 ч добавляют реагент для формирования детектируемого вещества (протеаза, 5 мкл) с последующей детекцией в микропланшетном флуоресцентном спектрофотометре (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific).

Во всех случаях сайт-специфическая протеаза расщепляет только нефосфорилированный пептид и удаляет сигнал FRET. Уровни фосфорилирования в каждой реакции рассчитывают с использованием отношения испускания кумарина (донора) по отношению к испусканию флуоресцеина (акцептора), где высокие отношения указывают на высокие уровни фосфорилирования, а низкие отношения указывают на низкие уровни фосфорилирования. Рассчитывают процент ингибирования в каждой реакции относительно неингибированного контроля, а затем на основе кривой концентрация-ответ рассчитывают концентрацию 50% ингибирования (значение IC<sub>50</sub>).

Способ 2. В этом способе используют те же этапы, что и в способе 1 выше, но используют более короткий период смешивания тестируемого соединения с белком GSK3 $\alpha$  (105 мин вместо 2 ч). Кроме того, используемые концентрации тестируемого соединения составляют 10, 1, 0,1 или 0,01 мкг/мл.

Клеточные анализы.

Соединение по изобретению исследовали с использованием одного или нескольких из приводимых ниже анализов.

(а) Ингибирование MAPK p38 $\alpha$  и Lck в клетках Jurkat.

Т-клетки Jurkat до эксперимента культивировали в обедненной среде (RPMI 1640+5% FBS) в течение 24 ч. Клетки собирали и ресуспендировали при  $10 \times 10^6$  клеток/мл в обедненной среде, а затем вносили в круглодонные 96-луночные планшеты при  $1 \times 10^6$  клеток/луночку. В течение 2 ч перед стимуляцией добавляли серийные разведения тестируемого соединения (конечная концентрация DMSO 1%). После прединкубации с соединением клетки стимулировали H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (конечная концентрация 0,05%) в течение 5 мин. Реакцию останавливали посредством центрифугирования при 2000 об/мин (3 мин, 4°C), затем удаляли супернатант и добавляли 100 мкл холодного фиксирующего/увеличивающего проницаемость раствора (набор BD Fix/Perm №554714). Планшеты инкубировали в течение 20 мин при 4°C с последующим центрифугированием и отмывкой с поставляемой  $1 \times$  отмывочной средой (набор BD Fix/Perm набор №554714). Клетки окрашивали на любую из фосфо-p38 $\alpha$  (T180/182), поставка Cell Signalling Technology (9211s), или фосфо-Lck (Y394), поставка R&D (MAB7500). Антитела разбавляли до 5 мкг/мл (R&D) или 1:200 (Cell Signalling Technology) в отмывочной среде с последующей инкубацией 1 ч при 4°C в темноте. После 3 повторений отмывки ледяным отмывочным буфером добавляли вторичные антитела (антитела к антителам кролика-FITC № F1362 или антитела к антителам мыши-FITC № F2883, Sigma) с разведением 1:1000 и инкубировали в течение 1 ч при 4°C в темноте. Клетки 3 раза промывали в холодном отмывочном буфере, затем после финальной отмывки в холодном PBS ресуспендировали в 150 мкл холодного PBS. Клетки анализировали посредством проточной цитометрии с использованием BD Accuri C6.

(аа) Индуцированное LPS высвобождение TNF $\alpha$ /IL-8 в клетках d-U937.

Клетки U937, линию моноцитарных клеток человека, подвергали дифференцировке в клетки макрофагального типа посредством инкубации с фоболмиристатацетатом (PMA; 100 нг/мл) в течение периода от 48 до 72 ч. Клетки прединкубируют с конечными концентрациями тестируемого соединения в течение 2 ч и затем стимулируют 0,1 мкг/мл LPS (из E.Coli:0111:B4, Sigma) в течение 4 ч. Супернатант собирают для определения концентраций TNF $\alpha$  и IL-8 концентрации посредством сэндвич-ELISA (Duo-set, R&D systems). Ингибирование продукции TNF $\alpha$  рассчитывают как процент от продукции TNF $\alpha$ , достигаемой под действием 10 мкг/мл BIRB796 при каждой из концентраций тестируемого соединения посредством сравнения относительно контроля носителя. На основании полученной кривой концентрация-ответ определяют относительную концентрацию 50% эффекта (REC<sub>50</sub>). Ингибирование продукции IL-8 рассчитывают при каждой концентрации тестируемого соединения посредством сравнения с контролем носителем. На основании полученной кривой концентрация-ответ определяют концентрацию 50% ингибирования (IC<sub>50</sub>).

(b) Индуцированное LPS высвобождение TNF $\alpha$ /IL-8 в клетках PBMC.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) здоровых индивидуумов выделяют из цельной крови с использованием градиент плотности (Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare). PBMC выселяют в 96-луночные планшеты и обрабатывают соединениями в желаемых концентрациях в течение 2 ч с последующим добавлением 1 нг/мл LPS (Escherichia Coli 0111:B4 из Sigma Aldrich) в течение 24 ч в нормальных условиях тканевой культуры (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Собирают супернатант для определения концентраций IL-8 и TNF $\alpha$  посредством сэндвич-ELISA (Duo-set, R&D systems) и считывания на микропланшетном флуоресцентном спектрофотометре (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific). На основании кривой доза-ответ рассчитывают концентрацию при 50% ингибировании (IC<sub>50</sub>) продукции IL-8 и TNF $\alpha$ .

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

PBMC здоровых индивидуумов выделяют из цельной крови с использованием градиента плотности (Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare). Клетки добавляют в 96-луночный планшет, предварительно покрытый смесью моноклональных антител к CD3/CD28 (0,3 мкг/мл eBioscience и 3 мкг/мл BD Pharmingen, соответственно). Затем в лунки добавляют соединения в желаемой концентрации и планшет оставляют на 3 суток в нормальных условиях тканевой культуры. Собирают супернатанты и высвобождение IL-2 и

IFN гамма определяют посредством сэндвич-ELISA (Duo-set, R&D System). На основании кривой доза-ответ определяют  $IC_{50}$ .

(d) Индуцируемое IL-1 $\beta$  высвобождение IL-8 в клетках HT29.

Клетки HT29, линия клеток аденокарциномы кишечника человека, высевают в 96-луночный планшет (24 ч) и предварительно обрабатывают соединениями в желаемой концентрации в течение 2 ч с последующим добавлением 5 нг/мл IL-1 $\beta$  (Abcam) в течение 24 ч. Собирают супернатанты для количественного определения IL-8 посредством сэндвич-ELISA (Duo-set, R&D System). На основании кривой доза-ответ определяют  $IC_{50}$ .

(e) Индуцируемое LPS высвобождение IL-8 и TNF $\alpha$  в первичных макрофагах.

PBMC здоровых индивидуумов выделяют из цельной крови с использованием градиента плотности (Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare). Клетки инкубируют в течение 2 ч и неприкрепившиеся клетки удаляют посредством отмывки. Для дифференцировки клеток в макрофаги их инкубируют с 5 нг/мл GM-CSF (Peprotech) в течение 7 суток в нормальных условиях тканевой культуры. Затем в клетки добавляют соединения в желаемой концентрации в течение 2 ч предварительной обработки с последующей стимуляцией 10 нг/мл LPS в течение 24 ч. Собирают супернатанты и высвобождение IL-8 и TNF $\alpha$  определяют посредством сэндвич-ELISA (Duo-set, R&D System). На основании кривой доза-ответ определяют  $IC_{50}$ .

(f) Индуцируемая поли I:C экспрессия ICAM-1 в клетках BEAS2B.

Поли-I:C используют в этих исследованиях в качестве простой имитации РНК-содержащего вируса. Смесь поли-I:C-олигофептамин (1 мкг/мл поли-I:C,  $\pm 2\%$  олигофептамина, 25 мкл; Invivogen Ltd., San Diego, CA, и Invitrogen, Carlsbad, CA, соответственно) трансфицируют в клетки BEAS2B (клетки эпителия бронхов человека, ATCC). Клетки прединкубируют с конечными концентрациями тестируемых соединений в течение 2 ч и уровень экспрессии ICAM1 на клеточной поверхности определяют посредством клеточного ELISA. В момент времени 18 ч после трансфекции поли-I:C клетки фиксируют 4% формальдегидом в PBS, а затем гасят эндогенную пероксидазу посредством добавления отмывочного буфера (100 мкл, 0,05% Tween в PBS:PBS-Tween), содержащего 0,1% азид натрия и 1% пероксид водорода. Клетки отмывают отмывочным буфером (3 $\times$ 200 мкл) и после блокирования лунок 5% молоком в PBS-Tween (100 мкл) в течение 1 ч клетки инкубируют с антителами к антителам к ICAM-1 человека (50 мкл; Cell Signalling Technology, Danvers, MA) в PBS с 1% BSA в течение ночи при 4°C.

Клетки отмывают PBS-Tween (3 $\times$ 200 мкл) и инкубируют со вторичными антителами (100 мкл; конъюгированные с HRP антитела к IgG кролика, Dako Ltd., Glostrup, Denmark). Затем клетки инкубируют с субстратом (50 мкл) в течение 2-20 мин с последующим добавлением останавливающего раствора (50 мкл, 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Сигнал ICAM-1 детектируют посредством определения оптической плотности при 450 нм относительно референсной длины волны 655 нм с использованием спектрофотометра. Затем клетки отмывают PBS-Tween (3 $\times$ 200 мкл) и определяют общие количества клеток в каждой лунке посредством определения оптической плотности при 595 нм после окрашивания кристаллическим фиолетовым (50 мкл 2% раствора в PBS) и элюции раствором 1% SDS (100 мкл) в дистиллированной воде. Определенные показатели OD<sub>450-655</sub> корректируют на количество клеток, деля на показатель OD<sub>595</sub> в каждой лунке. Ингибирование экспрессии ICAM-1 рассчитывают при каждой концентрации тестируемого соединения посредством сравнения с контролем носителем. На основании полученной кривой концентрация-ответ определяют концентрацию 50% ингибирования  $IC_{50}$ .

(g) Анализ митоза клеток.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) здоровых индивидуумов выделяют из цельной крови (Quintiles, London, UK) с использованием градиента плотности (Histopaque®-1077, Sigma-Aldrich, Poole, UK). Затем PBMC (3 миллиона клеток в образце) обрабатывают 2% PHA (фитогемагглютинин, Sigma-Aldrich, Poole, UK) в течение 48 ч с последующим воздействием различных концентраций тестируемых соединений в течение 20 ч. За 2 ч перед сбором PBMC обрабатывают демеколцином (0,1 мкг/мл; Invitrogen, Paisley, UK) для ареста клеток в метафазе. Для наблюдения клеток в митозе у PBMC повышают проницаемость и фиксируют, добавляя Intraprep (50 мкл; Beckman Coulter, France), и окрашивают антителами к фосфогистону 3 (0,26 нг/л; № 9701; Cell Signalling, Danvers, MA) и йодидом пропидия (1 мг/мл; Sigma-Aldrich, Poole, UK), как описано ранее (Muehlbauer P.A. and Schuler M.J., Mutation Research, 2003, 537:117-130).

Флуоресценция наблюдают с использованием проточного цитометра ATTUNE (Invitrogen, Paisley, UK), с пропусканием лимфоцитов. Для каждой обработки процент ингибирования митоза рассчитывают относительно обработки носителем (0,5% DMSO).

(h) Индуцируемые риновирусами высвобождение IL-8 и экспрессия ICAM-1.

Риновирус человек RV16 получают в American Type Culture Collection (Manassas, VA). Исходные растворы вирусов получают посредством инфицирования клеток HeLa HRV до достижения 80% цитопатических клеток.

Клетки BEAS2B инфицируют HRV при MOI 5 и инкубируют в течение 2 ч при 33°C с осторожным перемешиванием для обеспечения абсорбции. Затем клетки отмывают PBS, добавляют свежую среду и клетки инкубируют в течение дополнительных 72 ч. Супернатант собирают для анализа концентраций



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

Уровень экспрессии ICAM-1 на клеточной поверхности определяют посредством клеточного ELISA. Через 72 ч после инфицирования клетки фиксируют 4% формальдегидом в PBS. После гашения эндогенной пероксидазы посредством добавления 0,1% азида натрия и 1% пероксида водорода лунки отмывают отмывочным буфером (0,05% Tween в PBS: PBS-Tween). После блокирования лунок 5% молоком в PBS-Tween в течение 1 ч клетки инкубируют с антителами к антителам к ICAM-1 человека в 5% BSA PBS-Tween (1:500) в течение ночи. Лунки отмывают PBS-Tween и инкубируют со вторичными антителами (конъюгированные с HRP антитела к IgG кролика, Dako Ltd.). Сигнал ICAM-1 детектируют, добавляя субстрат и проводя определение при 450 нм с референсной длиной волны 655 нм с использованием спектрофотометра. Затем лунки отмывают PBS-Tween и определяют общие количества клеток в каждой лунке, определяя оптическую плотность при 595 нм после окрашивания кристаллическим фиолетовым и элюции раствором 1% SDS. Определенные показатели  $OD_{450-655}$  корректируют на количество клеток, деля на показатель  $OD_{595}$  в каждой лунке. Соединения добавляют за 2 ч до инфицирования HRV и через 2 ч после инфекции, когда отмывают не принявшие участие в инфицировании HRV.

(i) Оценка индуцированного HRV16 цитопатического действия (CPE) в клетках MRC5.

Клетки MRC5 инфицируют HRV16 при MOI 1 в DMEM, содержащей 5% ЭТС и 1,5 mM  $MgCl_2$ , с последующей инкубацией в течение 1 ч при 33°C для обеспечения адсорбции. Супернатанты удаляют, а затем добавляют свежую среду с последующей инкубацией в течение 4 суток. При необходимости клетки прединкубируют с соединением или DMSO в течение 2 ч и соединения и DMSO снова добавляют после отмывки вируса.

Супернатанты отбирают и инкубируют с раствором метиленового синего (100 мкл, 2% формальдегид, 10% метанол и 0,175% метиленового синего) в течение 2 ч при комнатной температуре. После отмывки добавляют 1% SDS в дистиллированной воде (100 мкл) в каждую лунку и планшеты слегка перемешивают в течение 1-2 ч с последующим определением оптической плотности при 660 нм. Для каждой лунки рассчитывают процент ингибирования. На основе кривой концентрация-ответ, получаемой посредством серийных разведений тестируемых соединений, рассчитывают значение  $IC_{50}$ .

(j) Вирусная нагрузка RSV *in vitro* в первичных клетках эпителия бронхов.

Нормальные клетки эпителия бронхов человека (NHBE), выращиваемые в 96-луночных планшетах, инфицируют RSV A2 (штамм A2, HPA, Salisbury, UK) при MOI 0,001 в среде LHC8: RPMI-1640 (50:50), содержащей 15 mM хлорид магния, и инкубируют в течение 1 ч при 37°C для адсорбции. Клетки отмывают PBS (3×200 мкл), затем добавляют свежую среду (200 мкл) и инкубацию продолжают в течение 4 суток. При необходимости клетки прединкубируют с соединением или DMSO в течение 2 ч, а затем их снова добавляют после отмывки вируса.

Клетки фиксируют 4% формальдегидом в растворе PBS (50 мкл) в течение 20 мин, промывают WB (3×200 мкл) (отмывочный буфер, PBS, содержащий 0,5% BSA и 0,05% Tween-20) и инкубируют с блокирующим раствором (5% сгущенное молоко в PBS) в течение 1 ч. Затем клетки отмывают WB (3×200 мкл) и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре с антителами к слитому белку F RSV (2F7) (40 мкл; моноклональные мыши, партия 798760, каталожный номер ab43812, Abcam) в 5% BSA в PBS-Tween. После отмывки клетки инкубируют с раствором конъюгированных с HRP вторичных антител (50 мкл) в 5% BSA в PBS-Tween (партия 00053170, каталожный № P0447, Dako), а затем добавляют субстрат TMB (50 мкл; упаковка реагента субстрата, партия 269472, каталожный номер DY999, R&D Systems, Inc.). Эту реакцию останавливают посредством добавления 2N  $H_2SO_4$  (50 мкл) и получаемый сигнал определяют колориметрически ( $OD$ : 450 нм с референсной длиной волны 655 нм) в микропланшетном спектрофотометре (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific).

Затем клетки отмывают и добавляют 2,5% раствор кристаллического фиолетового (50 мкл; партия 8656, каталожный номер PL7000, Pro-Lab Diagnostics) в течение 30 мин. После отмывки WB в каждую лунку добавляют 1% SDS в дистиллированной воде (100 мкл) и планшеты слегка перемешивают на шейкере в течение 1 ч с последующим определением оптической плотности при 595 нм. Определенные показатели  $OD_{450-655}$  корректируют на количество клеток, деля показатели  $OD_{450-655}$  на показатели  $OD_{595}$ . Для каждой лунки рассчитывают процент ингибирования и на основе кривой концентрация-ответ, получаемой на основе серийных разведений соединения, рассчитывают значение  $IC_{50}$ .

(k) Анализ жизнеспособности клеток: анализ МТТ.

Дифференцированные клетки U937 прединкубируют с каждым из тестируемых соединений (конечная концентрация 1 или 10 мкг/мл в 200 мкл среды, указанной ниже) по двум протоколам: первый - в течение 4 ч в среде RPMI1640 с 5% ЭТС и второй - в среде RPMI1640 с 10% ЭТС в течение 24 ч. Супернатант 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 DMSO (200 мкл) и планшеты слегка перемешивают в течение 1 ч с последующим определением оптической плотности при 550 нм. Для каждой лунки рассчитывают процент потери жизнеспособности клеток относительно обработки носителем (0,5% DMSO). Таким образом, явное увеличение жизнеспособности клеток при обработке лекарственным средством относительно носителя заносят в таблицу в качестве отрицательного процента.

## (1) Анализ биопсии человека.

Образцы биопсии слизистой кишечника получают из воспаленных областей кишечника пациентов с IBD. Материал биопсии нарезают на мелкие куски (2-3 мм) и помещают на стальные решетки в камере для органных культур при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub> в среде, не содержащей сыворотки. В ткань добавляют контроль DMSO или тестируемые соединения в желаемой концентрации и инкубируют в течение 24 ч в камере для органных культур. Супернатант отбирают для определения уровней IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  посредством ELISA R&D. Процент ингибирования высвобождения цитокинов тестируемыми соединениями рассчитывают относительно высвобождения цитокинов, определяемого для контроля DMSO (100%).

(m) Накопление  $\beta$ -катенина в клетках d-U937.

Клетки U937, линия моноцитарных клеток человека, подвергают дифференцировке в клетки макрофагального типа посредством инкубации с PMA (100 нг/мл) в течение периода от 48 до 72 часов. Затем клетки инкубируют с конечными концентрациями тестируемого соединения или носителем в течение 18 часов. Индукцию  $\beta$ -катенина тестируемыми соединениями останавливают посредством замены среды 4% раствором формальдегида. Эндогенную пероксидазную активность нейтрализуют посредством инкубации с гасящим буфером (100 мкл, 0,1% азид натрия, 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в PBS с 0,05% Tween-20) в течение 20 минут. Клетки отмывают отмывочным буфером (200 мкл, PBS, содержащий 0,05% Tween-20) и инкубируют с блокирующим раствором (200 мкл; 5% молоко в PBS) в течение 1 ч, повторно отмывают отмывочным буфером (200 мкл), а затем инкубируют в течение ночи с раствором антител к  $\beta$ -катенину (50 мкл) в 1% BSA/PBS (BD, Oxford, UK).

После отмывки отмывочным буфером (3 $\times$ 200 мкл; PBS, содержащий 0,05% Tween-20), клетки инкубируют с раствором конъюгированных с HRP вторичных антител (100 мкл) в 1% BSA/PBS (Dako, Cambridge, UK) и получаемый сигнал определяют колориметрически (OD: 450 нм с референсной длиной волны 655 нм) с использованием субстрата TMB (50 мкл; R&D Systems, Abingdon, UK). Эту реакцию останавливают посредством добавления 1N раствора H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 мкл). Затем клетки отмывают отмывочным буфером и добавляют 2% раствор кристаллического фиолетового (50 мкл) в течение 30 мин. После отмывки отмывочным буфером (3 $\times$ 200 мкл), в каждую лунку добавляют 1% SDS (100 мкл) и планшеты слегка перемешивают в течение 1 ч с последующим определением оптической плотности при 595 нм (Varioskan® Flash, Thermo-Fisher Scientific).

Определяемые показатели OD<sub>450-655</sub> корректируют на количество клеток, деля показатели OD<sub>450-655</sub> на показатели OD<sub>595</sub>. Для каждой лунки рассчитывают процент индукции относительно носителя и отношение индукции, нормализуют по сравнению с индукцией, продуцируемой стандартным контролем, содержащим эталонное соединение N-(4-(4-(3-(3-трет-бутил-1-п-толил-1H-пиразол-5-ил)уреидо)-нафталин-1-илокси)пиридин-2-ил)-2-метоксиацетамид (1 мкг/мл), которую определяют в качестве единицы.

## (n) Пролиферация Т-клеток.

PBMC здоровых индивидуумов выделяют из цельной крови с использованием градиента плотности (Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare). Фракцию лимфоцитов сначала обогащают CD4<sup>+</sup>-Т-клетками посредством отрицательной магнитной сортировки клеток по инструкциям производителя (Miltenyi Biotec 130-091-155). Затем наивные CD4<sup>+</sup>-Т-клетки отделяют с использованием положительного магнитного отбора CD45RA<sup>+</sup> клеток с использованием микрогранул по инструкциям производителя (130-045-901). Клетки высевает при 2 $\times$ 10<sup>5</sup> клеток на лунку в 96-луночный плоскодонный планшет (Corning Costar) в 100 мкл RPMI/10% FBS. 25 мкл тестируемого соединения разбавляют до подходящей концентрации (конечная концентрация 8 $\times$ ) в нормальной среде и добавляют в дублированные лунки в планшете с получением диапазона доза-ответ 0,03-250 нг/мл. В качестве отрицательного контроля добавляют DMSO. Планшеты прединкубируют в течение 2 ч с последующей стимуляцией 1 мкг/мл антител к CD3 (ОКТ3; eBioscience). Через 72 ч среду в каждой лунке заменяют 150 мкл свежей среды, содержащей 10 мкМ BrdU (Roche). Через 16 ч супернатант удаляют, планшет сушат и клетки фиксируют, добавляя в каждую лунку 100 мкл фиксирующего/денатурирующего раствора в течение 20 мин по инструкциям производителя (Roche). Планшеты однократно отмывают PBS с последующим добавлением детектирующих антител к BrdU и инкубируют в течение 90 мин при комнатной температуре. Затем планшеты осторожно 3 $\times$  отмывают поставленным отмывочным буфером и проявляют посредством добавления 100 мкл раствора субстрата. Реакцию останавливают посредством добавления 50 мкл 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и определяют оптическую плотность при 450 нм на планшетном спектрофотометре (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific). На основании кривой доза-ответ определяют IC<sub>50</sub>.

(o) Высвобождение IL-2 и IFN $\gamma$  в стимулированных CD3/CD28 клетках LPMC у пациентов с IBD.

Из воспаленной слизистой IBD хирургических образцов или нормальной слизистой хирургических образцов выделяют мононуклеарные клетки собственной пластинки (LPMC) и очищают следующим образом.

Скальпелем извлекают слизистую из глубоких слоев хирургических образцов и разрезают на фрагменты размером 3-4 мм. Удаляют эпителий посредством тройной промывки фрагментов ткани 1 mM ЭДТА (Sigma-Aldrich, Poole, UK) в HBSS (Sigma-Aldrich) с перемешиванием с использованием магнитной

мешалки, удаляя супернатант после каждой отмытки. Затем образец обрабатывают коллагеназой типа 1A (1 мг/мл; Sigma-Aldrich) в течение 1 ч с перемешиванием при 37°C. Затем полученную клеточную суспензию фильтруют с использованием 100 мкм клеточного фильтра, дважды промывают, ресуспендируют в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина и используют для культуры клеток.

Свежевыделенные LPMC ( $2 \times 10^5$  клеток/лунку) стимулируют 1 мкг/мл  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 в течение 48 ч в присутствии контроля DMSO или соответствующих концентраций соединения. Через 48 ч супернатант отбирают и анализируют на присутствие TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  посредством ELISA R&D. Процент ингибирования высвобождения цитокинов тестируемыми соединениями рассчитывают относительно высвобождения цитокинов, определяемого для контроля DMSO (100%).

(р) Ингибирование высвобождения цитокинов из миофибробластов, выделяемых у пациентов с IBD.

Миофибробласты воспаленной слизистой при IBD выделяли следующим образом.

Слизистую разрезают и отбирают и образцы слизистой размером 1 мм культивируют при 37°C в увлажненном CO<sub>2</sub>-инкубаторе в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM, Sigma-Aldrich), дополненной 20% FBS, 1% заменимыми аминокислотами (Invitrogen, Paisley, UK), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 50 мкг/мл гентамицина и 1 мкг/мл амфотерицина (Sigma-Aldrich). Полученные колонии миофибробластов высевает в 25-см<sup>2</sup> флаконы для культивирования и культивируют в DMEM, дополненной 20% FBS и антибиотиками по меньшей мере в течение 4 пересевов с получением достаточного количества для применения в экспериментах по стимуляции.

Субконфлуэнтные монослои миофибробластов, высеваемых в 12-луночные планшеты при  $3 \times 10^5$  клеток/лунку содержат в среде, не содержащей сыворотку, в течение 24 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, с последующим культивированием в течение 24 ч в присутствии контроля DMSO или соответствующих концентраций соединения. Через 24 ч супернатант отбирают и анализируют на присутствие IL-8 и IL-6 посредством ELISA R&D. Процент ингибирования высвобождения цитокинов посредством тестируемых соединений рассчитывают относительно высвобождения цитокинов, определяемого для контроля DMSO (100%).

(q) Дегрануляция нейтрофилов человека.

Нейтрофилы выделяют из периферической крови человека следующим образом.

Кровь собирают посредством венепункции и коагуляцию предотвращают посредством добавления ЭДТА:стерильного фосфатно-солевого буфера (PBS, без Ca<sup>+</sup>/Mg<sup>+</sup>) 1:1. Добавляют декстран (3% мас./об.) (1 часть раствора декстрана на 4 части крови) и крови позволяют отстаиваться в течение приблизительно 20 минут при комнатной температуре. Супернатант осторожно настилают на градиент плотности (Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare) и центрифугируют (15 мин, 2000 об/мин, без торможения). Супернатант аспирируют и клеточный осадок ресуспендируют в стерильном солевом растворе (0,2%) в течение периода не более 60 с (для лизиса засоряющих эритроцитов). Затем добавляют 10-кратный объем PBS и клетки центрифугируют (5 мин, 1200 об/мин). Клетки ресуспендируют в HBSS+ (буферный солевой раствор Хэнкса (без фенолового красного) содержащий цитохалазин В (5 мкг/мл) и 1 mM CaCl<sub>2</sub>) с получением  $5 \times 10^6$  клеток/мл.

$5 \times 10^4$  клеток добавляют в каждую лунку 96-луночного планшета с V-образным дном и инкубируют (30 мин, 37°C) с соответствующими концентрациями тестируемого соединения (0,3-1000 нг/мл) или носителем (DMSO, конечная концентрация 0,5%). Дегрануляцию стимулируют посредством добавления fMLP (конечная концентрация 1 мкМ). После дополнительной инкубации (30 мин, 37°C), клетки удаляют посредством центрифугирования (5 мин, 1500 об/мин) и супернатанты переносят в плоскодонный 96-луночный планшет. Добавляют равный объем тетраметилбензидина (TMB) и через 10 мин реакцию останавливают посредством добавления равного объема серной кислоты (0,5M) и определяют оптическую плотность при 450 нм (вычитают фон при 655 нм). На основании полученной кривой концентрация-ответ определяют концентрацию при 50% ингибировании (IC<sub>50</sub>).

(г) Анализ клеточной цитотоксичности.

$1 \times 10^5$  клеток Jurkat (иммортизированные Т-лимфоциты человека) добавляют в подходящее количество лунок 96-луночного планшета в 100 мкл среды (RPMI, дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой). В лунки добавляют 1 мкл контроля DMSO (конечная концентрация 1,0% об./об.) или тестируемого соединения (конечная концентрация 20, 5 или 1 мкг/мл) и инкубируют при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. через 24 ч планшет центрифугируют при 1200 об/мин в течение 3 мин и супернатант удаляют. Затем клетки ресуспендируют в 150 мкл (конечная концентрация 7,5 мкг/мл) йодида пропидия (PI) в PBS и инкубируют при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 15 мин. Через 15 мин клетки анализируют посредством проточной цитометрии (BD Accuri) с использованием окна FL3. % жизнеспособных клеток рассчитывают в виде % клеток, в которых в тестовых лунках не выявляют PI, нормализованный на контроль DMSO.

Скрининг in vivo: фармакодинамическая и противовоспалительная активность.

(i) Индуцированное LPS накопление нейтрофилов у мышей.

Неголодающим мышам Balb/c посредством интратрахеального маршрута в указанные моменты времени (в диапазоне 2-8 ч) перед стимуляцией воспалительного ответа посредством провокации LPS

дозировать носитель или тестируемое вещество. В момент  $T=0$  мышей помещают в затравочную камеру и подвергают действию LPS (7,0 мл, раствор 0,5 мг/мл в PBS) в течение 30 мин. Через дополнительные 8 ч животных подвергают анестезии, их трахеи канюлируют и получают BALF посредством инфузии, а затем извлечения из их легких 1,0 мл PBS посредством трахеального катетера. В образцах BALF определяют общее количество и количества дифференцированных лейкоцитов с использованием счетной камеры с сеткой Нейбауэра. Посредством цитоцентрифуги получают мазки образцов BALF посредством центрифугирования при 200 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре и окрашивают с использованием системы окрашивания DiffQuik (Dade Behring). Клетки подсчитывают с использованием масляно-иммерсионной микроскопии. Данный для количеств нейтрофилов в BAL представляют в виде среднего  $\pm$  S.E.M. (стандартная ошибка среднего). Для каждой обработки процент ингибирования накопления нейтрофилов рассчитывают относительно обработки носителем.

(ii) Модель сигаретного дыма.

Мышей A/J (самцы, возраст 5 недель) подвергают действию сигаретного дыма (4% сигаретный дым, разбавленный воздухом) в течение 30 мин/сутки в течение 11 суток с использованием системы Tobacco Smoke Inhalation Experiment System для малых животных (модель SIS-CS; Sibata Scientific Technology, Tokyo, Japan). Тестируемые вещества вводят интраназально (35 мкл раствора в 50% DMSO/PBS) раз в сутки в течение 3 суток после последнего воздействия сигаретным дымом. Через 12 ч после последнего дозирования каждое животное анестезируют, трахею канюлируют и собирают жидкость бронхоальвеолярного лаважа (BALF). Количества альвеолярных макрофагов и нейтрофилов определяют посредством анализа FACS (EPICS® ALTRA II, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) с использованием антител к MOMA2 мыши (макрофаги) или антител 7/4 к нейтрофилам мышей (нейтрофилы).

(iii) Индуцируемый DSS колит у мышей.

Неголодающим самцам мышей BDF1 в возрасте 10-12 недель за одни сутки (сутки -1) перед стимуляцией воспалительного ответа посредством обработки декстрансульфатом натрия (DSS) посредством перорального принудительного кормления дважды в сутки дозируют носитель, контрольное средство (5-ASA) или тестируемое соединение. На сутки 0 исследования вводят DSS (5% мас./об.) в питьевой воде с последующим дозированием носителя (5 мл/кг), контроля (100 мг/кг) или тестируемого соединения (5 мг/кг) дважды в сутки в течение 7 суток. Питьевую воду с DSS пополняют каждые 3 суток. В течение исследования животных взвешивают каждые сутки и проводят исследования стула и регистрируют в качестве показателя на основе консистенции стула. В момент умерщвления на сутки +6 удаляют толстую кишку и регистрируют ее длину и массу. Получают срезы кишки для анализа MPO для определения инфильтрации нейтрофилов или для гистопатологической классификации с определением тяжести заболевания.

(iv) Индуцированный TNBS колит у мышей.

Неголодающим самцам мышей BDF1 в возрасте 10-12 недель за сутки (сутки -1) перед стимуляцией воспалительного ответа посредством обработки 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS) (15 мг/мл в 50% этаноле/50% солевом растворе) посредством перорального принудительного кормления дважды в сутки дозируют носитель (5 мл/кг), контрольное средство (будезонид 2,5 мг/кг) или тестируемое соединение (1 или 5 мг/кг). На сутки 0 исследования внутрикишечно вводят TNBS (200 мкл) посредством пластикового катетера с дозированием носителя, контроля или тестируемого соединения дважды в сутки, продолжающегося в течение 2 или 4 суток. В течение исследования животных взвешивают каждые сутки и проводят исследования стула и регистрируют в качестве показателя на основе консистенции стула. В момент умерщвления на сутки 2 (или сутки 4) удаляют толстую кишку и регистрируют ее длину и массу. Получают срезы кишки для гистопатологической классификации с определением тяжести заболевания.

(v) Адоптивный перенос у мышей.

На сутки 0 исследования умерщвляют самок мышей Balb/C и получают селезенки для выделения клеток CD45RB<sup>high</sup> (с использованием протокола выделения клеток IBD у животных SCID). Затем приблизительно  $4 \times 10^5$  клеток/мл CD45RB<sup>high</sup> интраперитонеально инъецируют (100 мкл/мышь) самкам животных SCID. На сутки 14 исследования мышей взвешивают и случайно распределяют на группы обработки на основе массы тела. На сутки 14 дважды в сутки вводят соединения посредством перорального принудительного кормления в объеме дозы 5 мл/кг. Обработку продолжают до суток 42 исследования, когда животных умерщвляют через 4 ч после утреннего введения. Регистрируют длину и массу кишечника и используют их в качестве вторичного конечного показателя в исследовании в качестве определения отека кишечника. Затем кишечник посредством поперечных срезов разделяют на шесть частей, четыре из которых используют для гистопатологической классификации (первичный конечный показатель) и два гомогенизируют для анализа цитокинов. Представленные данные представляют собой % ингибирования индукционного окна между наивными животными и животными-носителями, где более высокое ингибирование означает более близкий к здоровому, наивному, фенотип.

(vi) Индуцируемый эндотоксином увеит у крыс.

Самцов крыс Lewis (в возрасте 6-8 недель, Charles River UK Limited) содержат в клетках по 3 при 19-21°C с циклом чередования света/темноты 12 ч (07:00/19:00) и содержат на стандартном питании кормом для грызунов и произвольном доступе к воде. Неголодающих крыс взвешивают, индивидуально метят на хвосте несмываемым маркером и проводят однократное интравитреальное введение в правое стекловидное тело (объем дозы 5 мкл) LPS (*Escherichia coli* 0111:B4 получаемому в PBS, Sigma Aldrich, UK) в количестве 100 нг/животному с использованием иглы калибра 32.

Необрабатываемым крысам инъектируют PBS. Посредством местного маршрута в правый глаз (10 мкл) животных за 1 ч до LPS, во время введения LPS и через 1, 2 и 4 ч после введения LPS вводят тестируемое соединение или носитель (4% полиоксил 40 стеарат, 4% маннит в PBS (pH 7,4)). Перед введением вводимый раствор обрабатывают ультразвуком для гарантии чистоты раствора. Через 6 ч после дозирования LPS животных подвергают эвтаназии посредством сверхдозы пентобарбитона (посредством сердечной пункции). Непосредственно после умерщвления из правого глаза крыс посредством пункции передней камеры с использованием иглы 32 калибра под хирургическим микроскопом отбирают 10 мкл водянистой влаги. Водянистую влагу разбавляют в 20 мкл PBS и сразу же определяют количеством клеток с использованием автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen). После отбора водянистой влаги правый глаз каждого животного энуклеируют и разрезают во фронтальном (переднем) и тыльном (заднем) сечениях рядом с хрусталиком. Каждое сечение взвешивают и гомогенизируют в 500 мкл стерильного фосфатно-солевого буфера с последующим центрифугированием в течение 20 мин при 12000 об/мин при 4°C. Полученный супернатант разделяют на 3 аликвоты и хранят при -80°C до последующего анализа цитокинов посредством DuoSet ELISA R&D.

Краткое изложение результатов скрининга in vitro и in vivo.

Таблица 1. Константы диссоциации для выбранных киназ, определенные посредством LeadHunter Discover Services (DiscoverX Corporation, Fremont, CA) с использованием технологии KINOMEScan™

Тестируемое соединение № примера	Константа диссоциации (нМ)		
	Lck	MAPK p38α	Syk
Пример 1	4,2	2,8	7,1

В исследованиях, проводимых LeadHunter Discover Services (DiscoverX Corporation, Fremont, CA) с использованием технологии KINOMEScan™, определено, что соединения из примера 1 не обладали достоверным действием на связывание киназ B-Raf и V-Raf (V600E) с их стандартными лигандами. Кроме того, это соединение продемонстрировало улучшенную селективность по сравнению с эталонным соединением N-(4-(4-(3-(3-трет-бутил-1-п-толил-1H-пиразол-5-ил)уреидо)нафталин-1-илокси)пиридин-2-ил)-2-метоксиацетамидом (WO 2010/112936), о чем свидетельствуют более низкие индексы селективности (табл. 1a).

Таблица 1a. Данные по индексам селективности KinomeScan при 50 и 500 нМ

Соединение	Индексы селективности KINOMEScan/количество отдельных выявленных киназ					
	50 нМ			500 нМ		
	S(35)	S(10)	S(1)	S(35)	S(10)	S(1)
Эталонное соединение	0,174/67	0,083/32	0,018/7	0,370/143	0,272/105	0,117/45
Пример 1	0,186/75	0,072/29	0,005/2	0,347/140	0,251/101	0,089/36

S(35) = (количество немутантных киназ с % от контроля < 35) / (количество тестируемых немутантных киназ);

S(10) = (количество немутантных киназ с % от контроля < 10) / (количество тестируемых немутантных киназ);

S(1) = (количество немутантных киназ с % от контроля < 1) / (количество тестируемых немутантных киназ)

Таблица 1b. Результаты анализа ингибирования MAPK p38α (способ 2), c-Src, Syk и GSK3α (способ 2) in vitro

Тестируемое соединение № примера	Значения IC <sub>50</sub> для ингибирования фермента (нМ)			
	MAPK p38α	c-Src	Syk	GSK3α
1	11	14	5	115

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

Тестируемое соединение		PBMC		
№ примера		IL-8	IL-2	IFN $\gamma$
1		6,1	1125,5	9,5

Как проиллюстрировано в табл. 3 ниже, соединение из примера по настоящему изобретению в анализе (g) выше, в котором определяют влияние на клеточное деление (митоз) у PBMC, является значительно менее активным, чем эталонное соединение (N-(4-(4-(3-(3-трет-бутил-1-п-толил-1H-пиразол-5-ил)уреидо)нафталин-1-илокси)пиримидин-2-ил)-2-метоксиацетамид; WO 2010/112936).

Подобным образом, соединение из примера по настоящему изобретению является значительно менее цитотоксичным, чем эталонное соединение в анализе клеточной цитотоксичности (г) выше, где продемонстрирована увеличенная жизнеспособность (табл. 3).

Таблица 3. Действие соединения по изобретению на клеточное деление у PBMC (н.т. - не тестировали) и на жизнеспособность клеток Jurkat

Тестируемое соединение	% ингибирования митоза при 5 мкг/мл	% жизнеспособности при 1 мкг/мл	% жизнеспособности при 5 мкг/мл	% жизнеспособности при 20 мкг/мл
Эталонное соединение	87,8 <sup>a</sup>	23,5	18,9	17,3
1	2,4	94,6	96,1	95,8

<sup>a</sup> См., например, значение, приведенное в WO 2013/050757.

Как проиллюстрировано в табл. 4 ниже, соединение из примера 1 значительно и зависимо от дозы снижало клеточную инфильтрацию, что выявляли по меньшим количествам клеток и уровням цитокина IL-1 $\beta$  в переднем и заднем сегментах глаз крыс, интравитриально обрабатываемых эндотоксином LPS (см. анализ (vi) выше).

Таблица 4. Зависимое от дозы действие соединения из примера 1 на уровни IL-1 $\beta$  и количества клеток в глазах стимулированных LPS крыс

Обработка	n	IL-1 $\beta$ (пг/мл) передняя ткань	IL-1 $\beta$ (пг/мл) задняя ткань	Количества клеток ( $\times 10^5$ /мл)
Не болели	5	14,1 $\pm$ 6,3	30,8 $\pm$ 11,3	1,8 $\pm$ 0,2
Контроль носителя	8	1636,6 $\pm$ 145,1	877,3 $\pm$ 115,6	69,9 $\pm$ 5,4
Пример 1 (1 мг/мл)	8	367,3 $\pm$ 100,4	188,1 $\pm$ 54,7	21,9 $\pm$ 5,0
Пример 1 (0,1 мг/мл)	8	791,2 $\pm$ 131,9	327,4 $\pm$ 61,4	30,4 $\pm$ 6,7
Пример 1 (0,01 мг/мл)	8	980,0 $\pm$ 110,8	740,5 $\pm$ 56,2	43,5 $\pm$ 6,3
Пример 1 (0,001 мг/мл)	8	1558,1 $\pm$ 145,7	867,9 $\pm$ 120,8	63,6 $\pm$ 7,0

Данные приведены как среднее  $\pm$  SEM.

Краткое изложение результатов дополнительных исследований.

Определение растворимостей в имитированном кишечном соке в голодном состоянии (FaSSCoF).

Растворимость соединения по изобретению в FaSSCoF при pH 6,5 определяют с использованием модификации ранее опубликованного способа (Vertzoni M. et al. Pharm. Res. 2010, 27, 2187-2196). Вместо используемого в исходном способе экстракта солей желчных кислот (который более недоступен) в модифицированном способе используют смесь таурохолатата натрия (0,15 г), гликохолевой кислоты (0,15 г), урсодезоксихолевой кислоты (0,05 г), холевой кислоты (0,05 г) и гликодезоксихолевой кислоты (0,05 г). Эти пять желчных кислот совместно растирают с использованием ступки и пестика с получением тонкодисперсного белого порошка, который добавляют в FaSSCoF, как описано ниже.

Среда FaSSCoF: трис(гидроксиметил)аминометан (Tris; 0,275 г) и малеиновую кислоту (0,44 г) растворяют в воде (35 мл) с получением раствора, pH которого доводят до 6,5 добавляя 0,5M NaOH (приблизительно 12 мл). Затем раствор доводят до 50 мл водой. Часть этого буферного раствора Tris/малеата

(приблизительно 25 мл) добавляют в 0,5 л круглодонную колбу с последующим добавлением 0,00565 г смеси желчных кислот, описанной выше. Добавляют растворы фосфатидилхолина (0,0111 г) в DCM (0,15 мл) и пальмитиновой кислоты (0,0013 г) в DCM (0,15 мл), затем органический растворитель выпаривают при пониженном давлении при 40°C до получения прозрачного раствора без осязательного запаха DCM. Объем раствора после выпаривания доводят до 50 мл, добавляя оставшийся буфер Tris/малеата, затем добавляют BSA (0,115 г) с последующим растворением посредством несильного перемешивания.

Определение растворимости. Тестируемые соединения суспендируют в среде FaSSCoF с pH 6,5 с получением максимальной конечной концентрации 2-10 мг/мл. Суспензии уравнивают при 25°C в течение 24 ч с последующим фильтрованием через стекловолоконный фильтр С. Затем фильтраты разбавляют, как необходимо для инъекции и количественного анализа посредством ВЭЖХ относительно стандарта. Инъектируют различные объемы стандарта разведенных и неразведенных растворов образцов и растворимость определяют с использованием пиковых областей, определяемых посредством интеграции пиков, выявленных при одном времени удержания в качестве основного пика при инъекции стандарта.

Растворимость в FaSSCoF приведена в табл. 5 ниже, в которой видно, что соединение из примера демонстрировало растворимость в среде FaSSCoF при pH 6,5 более 0,01 мг/мл. Для соединения из примера по настоящему изобретению растворимость в FaSSCoF при pH 6,5 была выше, чем растворимость у эталонного соединения А, 3-((4-((4-(3-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1Н-пиразол-5-ил)уреидо)нафталин-1-ил)окси)пиримидин-2-ил)амино)-5-этинил-N-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)-этил)бензамида (Fyfe M.C.T., WO 2014/140582).

Таблица 5. Растворимость, определяемая для соединения из примера по изобретению в FaSSCoF при pH 6,5

Тестируемое соединение № примера	Растворимость в FaSSCoF при pH 6,5 (мг/мл)			
	Проход 1	Проход 2	Проход 3	Проход 4
Эталонное соединение А	<0,001	<0,001		
1	0,016	0,018	0,010	0,011
1 (натриевая соль)	0,031	0,032	0,020	0,025
1 (гидрохлорид)	0,016	0,015	–	–

Определение фармакокинетических параметров.

Исследования проводили в Sai Life Sciences (Hinjewadi, Pune, India) с исследованием системной фармакокинетики и общего распределения в тканях кишечника соединения по изобретению. В частности, фармакокинетические исследования проводили на самцах мышей C57BL/6 после однократного перорального введения соединения.

Из данных, приведенных в табл. 6, видно, что соединение по изобретению достигает существенных концентраций в кишечнике, при этом, напротив, системные концентрации в плазме или крови являются очень низкими или незначительными.

Таблица 6. Средние концентрации в плазме или крови (нг/мл) или общие уровни в кишечнике (нг/г), получаемые после перорального введения соединения по изобретению мышами при 5 мг/кг

№ примера соединения		Mx	Время (часы)							
D	M		0,5	1	2	4	6	8	12	24
1 (соль Na)	1	Pl	44,9	49,2	13,0	5,2	1,9	0,6	5,3	0,0
		TC	4,3	9,3	52,4	10,403	4,049	12,898	535	41,4

Носитель=0,1% Tween 80 в 0,5% растворе метилцеллюлозы, получаемом в воде.

Ключ к табл. 6.

D - вводимое (дозированное) соединение;

M - определяемое соединение;

Mx - матрикс;

Pl - плазма;

Bd - кровь;

TC - всего в кишечнике.

Исследования ингибирования hERG.

Соединение по изобретению тестировали на ингибирование калиевых ионных каналов человека (hERG) с использованием электрофизиологического способа фиксации потенциала IonWorks™ в Essen Bioscience (Welwyn Garden City, England).

Таблица 7. Данные ингибирования hERG для соединения по изобретению

Пример	IC <sub>50</sub> (мкМ)	% ингибирования при наибольшей концентрации	Наибольшая концентрация
1	>3, 3	–4	3 мкМ

Исследования острого раздражения/разъедания глаз.

Задача исследования острого раздражения/разъедания глаз ставилась для оценки потенциальной способности к раздражению или разъеданию у соединения из примера 1 на двух выбранных уровнях дозирования (0,1 и 1,0 мг/мл) по сравнению с носителем (4% мас./об. полиоксиэтилен 40 стеарат/4% мас./об. маннит/фосфатный буфер (pH 7,4) раствор) после одних суток обработки (фаза 1) или трех последовательных суток обработки (фаза 2) при четырех суточных введениях (с разницей в 4 ч) посредством глазного маршрута (двусторонние инстилляций 40 мкл/глаз/инстилляцию) в глаза кроликов-альбиносов New Zealand White (в возрасте 13-15 недель в начале дозирования; 2 самца и 2 самки на группу дозирования).

В течение исследования непредусмотренных случаев гибели не было, также как и клинических симптомов, связанных с тестируемым средством. Кроме того, не наблюдали влияния на массу тела и на потребление пищи.

В фазе 1 во всех группах после инстилляций носителя или тестируемого средства, пример 1, состав с любым уровнем дозирования, глазные реакции в основном ограничивались покраснением конъюнктивы (степени 1 или 2) и иногда хемозом (степени 1) и выделениями (степени 1). Эти показатели являлись от незначительных до умеренных. Различий в частоте, тяжести и частоте возникновения у обработанных соединением из примера 1 и контролем носителем животных не наблюдали. Наиболее частой реакцией являлось покраснение конъюнктивы, и оно уже присутствовало (в степени 1) до начала дозирования. Известно, что эта местная реакция часто спонтанно возникает у кроликов-альбиносов при исследовании глаз, и она связана с многочисленными исследованиями глаз, проводимыми у животных. Хемоз и выделения спорадически наблюдали во всех группах после первой инстилляции и затем через 3 суток периода наблюдения. Кроме того, в глазах двух групп кроликов с высоким дозированием (1 мг/мл) и в одной группе самок с обработкой носителем периодически и с одной из сторон наблюдали гиперемию радужной оболочки. Тест Дрейза подтверждал целостность роговицы после одной обработки в сутки и у всех животных во всех случаях фотомоторный рефлекс являлся нормальным. В итоге, местную переносимость составов после однократного дозирования в сутки, таким образом, считали приемлемой, после инстилляций носителя или составов, содержащих соединение из примера 1, наблюдали сходные местные реакции, что свидетельствует об умеренном связанном с носителем влиянии на переносимость для глаз.

В фазе 2 во всех группах после инстилляций носителя или тестируемого средства составы с любым уровнем дозирования основные глазные реакции были ограничены покраснением конъюнктивы (степени 1). Этот показатель являлся незначительным, и его регистрировали без какого-либо значимого различия по частоте возникновения и частоте в группах на всем протяжении 3 суток периода обработки. Периодически тяжесть в группе, обрабатываемой носителем, была выше (степени 2), чем в группах, обрабатываемых тестируемым средством. Это покраснение конъюнктивы было устойчивым, и его наблюдали до первой инстилляции на следующие сутки. Кроме того, в глазах двух групп кроликов с высоким дозированием и в одной группе самок с обработкой носителем периодически наблюдали гиперемию радужной оболочки. Ни у одного из животных не наблюдали ни одного случая выделений. Тест Дрейза подтверждал целостность роговицы в течение 3 суток периода обработки. У всех животных во всех случаях фотомоторный рефлекс являлся нормальным. В итоге, местную переносимость составов для 3 суток обработки, таким образом, считали приемлемой без каких-либо осложнений. После инстилляций одного носителя или составов, содержащих соединение из примера 1, наблюдали сходные местные реакции, что свидетельствует об умеренном связанном с носителем влиянии на переносимость для глаз.

Оценка мутагенности (скрининг обратных мутаций бактерий).

Исследования оценки способности соединения из примера 1 к индукции мутаций у четырех гистидин-зависимых ауксотрофных мутантов *Salmonella typhimurium* штаммов TA1535, TA1537, TA98 и TA100 и одного триптофан-зависимого ауксотрофного мутанта *Escherichia coli* WP2 *uvrA* *in vitro* проводили в Sequani (Ledbury, Herefordshire, UK).

Скрининг мутаций проводили способом внесения в чашки, и его проводили в присутствии и отсутствии смеси S-9 (постмитохондриальная фракция печени, получаемая из печени обработанных Aroclor 1254 крыс). Бактерии подвергали действию соединения из примера 1, растворенного в диметилсульфоксиде, который также использовали в качестве отрицательного контроля. Химическими веществами положительного контроля в отсутствие смеси S-9 являлись азид натрия (TA1535 и TA100), 9-аминоакридин (TA1537), 2-нитрофлуорен (TA98) и 4-нитрохинолин-N-оксид (WP2 *uvrA*), а в присутствии смеси S-9-2-аминоантрацен (для всех штаммов).

Дозы соединения из примера 1, используемого в тесте на мутации в условиях внесения в чашки, составляли 15, 50, 150, 500 или 1500 мкг/чашку для всех штаммов в присутствии и отсутствии смеси S-9.



Соединение из примера 1 анализировали вплоть до предела растворимости 1500 мкг/чашку для всех штаммов в присутствии и отсутствии смеси S-9 в условиях внесения в чашки.

Осаждение наблюдали при 500 мкг/чашку для TA1537 и TA98 в присутствии смеси S-9 и при 1500 мкг/чашку для всех штаммов в присутствии и отсутствии смеси S-9. Также наблюдали снижение среднего количества колоний при 500 мкг/чашку и 1500 мкг/чашку для TA98 и при 1500 мкг/чашку для TA1535 в присутствии смеси S-9, что свидетельствует о токсичности тестируемого средства для бактерий.

Ни у одного из штаммов ни при каком уровне дозирования соединения из примера 1 в присутствии или отсутствии смеси S-9 в условиях внесения в чашки зависимого от дозы или статистически значимого увеличения количеств ревертантов не наблюдали. Это свидетельствует об отсутствии у соединений из примера 1 какого-либо мутагенного действия в условиях тестирования.

Исследования устойчивости к гидролизу.

Химическую стабильность соединения по изобретению можно оценивать в смеси DMSO и воды (3:1) при концентрации тестируемого соединения 1 мг/мл.

Общий способ ВЭЖХ.

Колонка - Agilent, Waters X-Select C18, 2,5 мкм, 4,6×30 мм, длительность способа - 4 мин, 5-95% MeCN/вода (0,1% муравьиная кислота). Скорость потока - 2,5 мл/мин. Температура термостата для колонки - 40°C. Детекция - 254 нм.

Получение образцов.

1,0 мг образца тестируемого соединения растворяют в 750 мкл DMSO. Медленно добавляют воду (250 мкл), обеспечивая отсутствие осаждения.

Регистрация стабильности.

Отбирают аликвоту тестируемого раствора объемом 50 мкл и анализируют в двух повторениях посредством ВЭЖХ с инъекциями по 5 мкл. Регистрируют пиковую площадь тестируемого соединения с последующим ручным интегрированием соответствующей кривой в УФ.

Тестируемый раствор нагревают до 60°C с перемешиванием и в моменты времени 5 и 24 ч отбирают аликвоты объемом 50 мкл для анализа ВЭЖХ. Во всех случаях используют инъекции по 5 мкл и образцы анализируют в двух повторениях.

Регистрируют пиковые области тестируемых соединений для обоих последовательных моментов времени и рассчитывают % разрушения на основе % изменения пиковой области в зависимости от времени.

В каждое исследование стабильности включают эталонное 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; Cariou C.A.M. et al., WO 2014/027209) в качестве контроля для подтверждения исследования.

Стабильность фармацевтических составов.

Получали по 20 мл исходных растворов солей соединения из примера 1 с натрием (Na) и гидрохлоридом (HCl) с концентрацией 1 мг/мл в двух повторениях следующим образом: соответствующие количества каждой соли смешивали с 10 mM фосфатным буфером с pH 7,2, содержащим 4,5% маннит и 3% полиоксил 40 стеарат. Образцы подвергали обработке ультразвуком до достижения прозрачных растворов со следующими параметрами: осмоляльность (мОсм/кг): 310 (Na), 314 (HCl); pH: 7,00 (Na), 7,05 (HCl). 0,5 мл исходных растворов разбавляли до 1 мл 20% DMSO в воде и использовали для инъекции в анализе чистоты посредством ВЭЖХ. Затем оставшиеся исходные растворы разделяли на аликвоты по 0,5 мл в пробирки для ВЭЖХ и хранили в различных условиях в двух повторениях. Образцы хранили при 5 и 25°C с последующим анализом посредством ВЭЖХ на 1, 2 и 4 недели. Отдельные образцы хранили при 40°C и анализировали на 4 неделе. Анализ, представленный в таблице ниже, продемонстрировал, что соединение из примера 1 является стабильным в растворе при 5°C.

Тестируемое вещество	Образец	Исходная чистота (%)	Температура (°C)	Чистота (%) на неделе n		
				n=1	n=2	n=4
Пример 1, натриевая соль	1	98,6	5	98,2	98,4	98,3
			25	98,4	98,1	97,6
			40	–	–	76,0
	2	98,5	5	98,4	98,5	98,4
			25	98,5	98,1	97,6
			40	–	–	73,7
Пример 1, гидрохлорид	1	98,1	5	98,2	98,1	97,9
			25	98,0	97,7	97,2
			40	–	–	79,2
	2	98,1	5	98,2	98,0	98,0
			25	98,0	97,6	97,4
			40	–	–	80,4

## Сокращения

AcOH	ледяная уксусная кислота
водн.	водный
5-ASA	5-аминосалициловая кислота
АТФ	аденозин-5'-трифосфат
BALF	жидкость бронхоальвеолярного лаважа
BID	дважды в сутки
BINAP	2,2'-бис(дифенилфосфино)-1,1'-бинафтил
BOP	гексафторфосфат (бензотриазол-1-илокси) трис (диметиламино) фосфиния
ушир.	уширенный
BrdU	5-бром-2'-дезокситуридин
BSA	бычий сывороточный альбумин
CatCart®	каталитический картридж
CDI	1,1-карбонилдиимидазол
COPD	хроническое обструктивное заболевание легких
д	дублет
dba	дибензилиденацетон
DBU	1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен
DCC	дициклогексилкарбодиимид
DCM	дихлорметан
DIAD	диизопропилазодикарбоксилат
DIPEA	диизопропилэтиламин
DMAP	4-диметиламинопиридин
DMEM	модифицированная Дульбекко среда Игла
DMF	N,N-диметилформамид
DMSO	диметилсульфоксид
DPPA	дифенилфосфорилазид

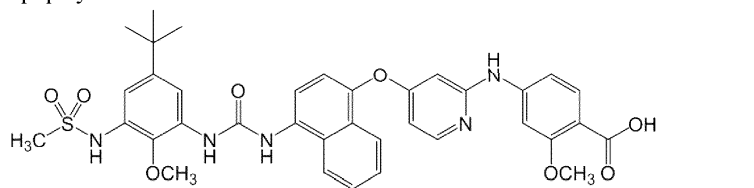
клетки d-U937	дифференцированные посредством РМА клетки U-937
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
ELISA	твердофазный иммуноферментный анализ
(ES <sup>-</sup> )	ионизация распылением в электрическом поле, отрицательный режим
(ES <sup>+</sup> )	ионизация распылением в электрическом поле, положительный режим
Et	этил
Et <sub>3</sub> N	триэтиламин
EtOAc	этилацетат
EtOH	этанол
FACS	активируемая флуоресценцией сортировка клеток
FBS	эмбриональная телячья сыворотка
ЭТС	эмбриональная телячья сыворотка
fMLP	формилметиониллейцилфенилаланин
FRET	резонансный перенос энергии флуоресценции
GSK3α	киназа гликогенсинтетазы 3α
HBEC	первичные клетки эпителия бронхов человека
HBSS	сбалансированный солевой раствор Хэнка
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
HPMC	гидроксипропилметилцеллюлоза
час	час (ов)
HATU	гексафторфосфат 2-(1H-7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония
HOAt	1-гидрокси-7-азабензотриазол
HOBT	гидроксibenзотриазол
HRP	пероксидаза хрена
HRV	риновирус человека
ICAM-1	межклеточная молекула адгезии 1
IFNγ	интерферон-γ
IL	интерлейкин
iPrOAc	изопропилацетат
JNK	N-концевая киназа c-Jun
LC	жидкостная хроматография
Lck	лимфоцит-специфическая протеинтирозинкиназа
LPS	липополисахарид
м	мультиплет
(M+H) <sup>+</sup>	протонированный молекулярный ион
МАРК	митоген-активируемая протеинкиназа
МАРКАР-K2	активируемая митоген-активируемой протеинкиназой

	протеинкиназа 2
mCPBA	метахлорпербензойная кислота
Me	метил
MeCN	ацетонитрил
MeOH	метанол
МГц	мегагерц
мин	минута (ы)
MMAD	массовый средний аэродинамический диаметр
MOI	множественность заражения
MPO	миелопероксидаза
MTT	бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия
MS	масс-спектрометрия
масса/заряд	отношения массы к заряду
NMP	N-метилпирролидинон
ЯМР	ядерный магнитный резонанс (спектроскопия)
OD	оптическая плотность
PBMC	моноклеарные клетки периферической крови
PBS	фосфатно-солевой буфер
Ph	фенил
PNA	фитогемагглютинин
PMA	форболмиристатацетат
pTSA	4-метилбензолсульфоновая кислота (паратолуолсульфоновая кислота)
PyBOP	гексафторфосфат (бензотриазол-1-илокси) трипирролидинофосфиния
к	квартет
rt или RT	комнатная температура
RP ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой
об./мин.	оборотов в минуту
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSV	респираторно-синцитиальный вирус
с	синглет
насыщ.	насыщенный
SCID	тяжелый комбинированный иммунодефицит
SCX	катионный обмен на твердой подложке (смола)
SDS	додecilсульфат натрия
S <sub>N</sub> Ar	нуклеофильное ароматическое замещение
Syk	тирозинкиназа селезенки
т	триплет
T3P	циклический ангидрид 1-пропанфосфоновой кислоты
TBAF	фторид тетрабутиламмония
TBDMS	трет-бутилдиметилсилил
TCID <sub>50</sub>	инфицирующая 50% тканевой культуры доза
TEA	триэтиламин
THF	тетрагидрофуран
TFA	трифторуксусная кислота
TGFβ	трансформирующий фактор роста бета
TIPS	триизопропилсилил
TMB	3,3',5,5'-тетраметилбензидин
TMS-Cl	триметилсилилхлорид
TNFα	фактор некроза опухоли альфа

Префиксы н-, втор-, изо- и трет- имеют их обычные значения: нормальный, вторичный, изо и третичный.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

## 1. Соединение формулы I



или его фармацевтически приемлемая соль, или изотопное производное, где производное является изотопно обогащенным или меченым одним или несколькими атомами дейтерия.

2. Соединение по п.1, которое представляет собой 4-((4-(3-(5-(трет-бутил)-2-метокси-3-(метилсульфонамидо)фенил)уреидо)нафталин-1-ил)окси)пиридин-2-ил)амино)-2-метоксибензойную кислоту.

3. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п.1, или его фармацевтически приемлемую соль, или изотопное производное в смеси с фармацевтически приемлемыми вспомогательным средством, разбавителем или носителем.

4. Применение соединения по п.1, или его фармацевтически приемлемой соли, или изотопного производного в качестве лекарственного средства, обладающего противовоспалительными свойствами.

5. Применение соединения по п.1, или его фармацевтически приемлемой соли, или изотопного производного для лечения или профилактики воспалительного заболевания.

6. Применение фармацевтической композиции по п.3 для лечения или профилактики воспалительного заболевания.

7. Применение по п.5 или 6, где воспалительное заболевание выбрано из списка, включающего муковисцидоз (кистозный фиброз), легочную гипертензию, саркоидоз легких, идиопатический легочный фиброз, COPD (включая хронический бронхит и эмфизему), астму, астму детей, атопический дерматит, аллергический дерматит, контактный дерматит или псориаз, аллергический ринит, ринит, синусит, конъюнктивит, аллергический конъюнктивит, сухой кератоконъюнктивит (синдром сухих глаз или ксерофтальмию), глаукому, диабетическую ретинопатию, отек желтого пятна (включая диабетический отек желтого пятна), окклюзию центральной вены сетчатки (CRVO), сухую и/или влажную формы возрастной дегенерации желтого пятна (AMD), послеоперационное воспаление при катаракте, увеит (включая передний, задний и панувеит), трансплантат роговицы и отторжение трансплантата лимбальных клеток, глютензависимую энтеропатию (целиакию), эозинофильный эзофагит, кишечную реакцию "трансплантат против хозяина", болезнь Крона и язвенный колит.

8. Применение по п.5 или 6, где воспалительное заболевание представляет собой увеит, сухой кератоконъюнктивит (синдром сухих глаз или ксерофтальмию), болезнь Крона или язвенный колит.

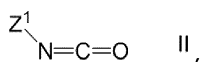
9. Применение по п.5 или 6, где воспалительное заболевание представляет собой сухой кератоконъюнктивит (синдром сухих глаз или ксерофтальмию).

10. Применение соединения по п.1, или его фармацевтически приемлемой соли, или изотопного производного для получения лекарственного средства для лечения или профилактики воспалительного заболевания, как определено в любом из пп.5-9.

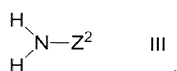
11. Применение фармацевтической композиции по п.3 для получения лекарственного средства для лечения или профилактики воспалительного заболевания, как определено в любом из пп.7-9.

12. Способ лечения или профилактики воспалительного заболевания, как определено в любом из пп.7-9, включающий введение индивидууму эффективного количества соединения по п.1, или его фармацевтически приемлемой соли, или изотопного производного, или фармацевтической композиции по п.3.

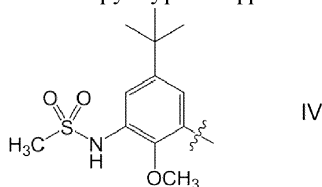
13. Способ получения соединения формулы I по п.1, включающий реакцию соединения формулы II



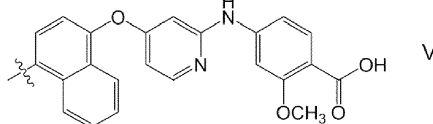
с соединением формулы III



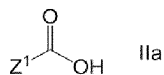
где один из  $Z^1$  и  $Z^2$  представляет собой структурный фрагмент формулы IV



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



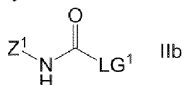
14. Способ получения соединения формулы I по п.1, включающий реакцию соединения формулы IIa



где  $Z^1$  является таким, как определено выше,

с дифенилфосфорилазидом, где за этой реакцией без выделения следует термическая перегруппировка промежуточного соединения ацилазида (формулы  $Z^1-C(O)-N_3$ ) с получением in situ соединения формулы II, как определено в п.13, которое затем подвергают реакции с соединением формулы III, как определено в п.13.

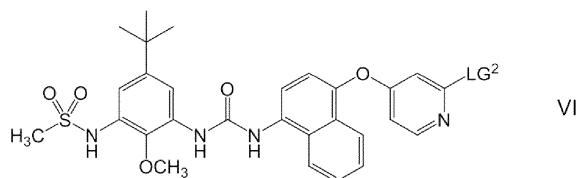
15. Способ получения соединения формулы I, включающий реакцию соединения формулы IIb



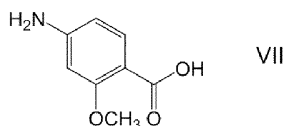
где  $LG^1$  представляет собой имидазолил, хлор или  $C_{6-14}$  арилокси, а  $Z^1$  является таким, как определено в п.13,

с соединением формулы III, как определено в п.13.

16. Способ получения соединения формулы I по п.1, включающий реакцию соединения формулы VI

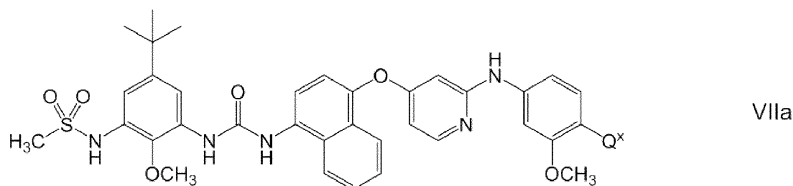


где  $LG^2$  представляет собой галогеновую группу, с соединением формулы VII



17. Способ получения соединения формулы I по п.1, включающий снятие защиты с защищенного производного соединения формулы I, где защищенное производное представляет собой соединение, в котором атом O карбоновой кислоты защищен бензильной группой или алкильной группой, выбранной из метила, этила, н-пропила, изопропила, бутила, н-бутила и трет-бутила.

18. Способ по п.17, где защищенное производное соединения формулы I представляет собой соединение формулы VIIa

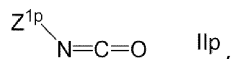


где  $Q^x$  представляет собой  $-C(O)O-C_{1-4}$  алкил.

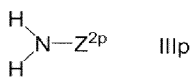
19. Соединение формулы VIIa, как определено в п.18, или его соль.

20. Соединение формулы VIIa или его соль по п.19, где указанное соединение представляет собой метил-4-((4-((4-(3-(5-(трет-бутил)-2-метокси-3-(метилсульфонамидо)фенил)уреидо)нафталин-1-ил)окси)пиридин-2-ил)амино)-2-метоксибензоат.

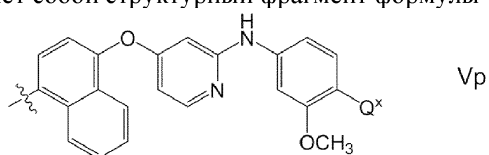
21. Способ получения соединения формулы I, как определено в п.18, включающий реакцию соединения формулы IIp



с соединением формулы IIIp

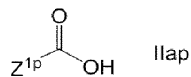


где один из  $Z^{1p}$  и  $Z^{2p}$  представляет собой структурный фрагмент формулы IV, как определено в п.13, а другой из  $Z^{1p}$  и  $Z^{2p}$  представляет собой структурный фрагмент формулы Vp



где  $Q^x$  определен в п.18.

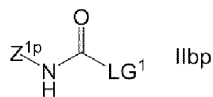
22. Способ получения соединения формулы VIIa, как определено в п.18, включающий реакцию соединения формулы IIap



где  $Z^{1p}$  является таким, как определено в п.21,

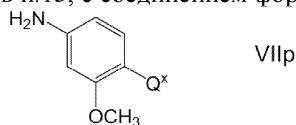
с дифенилфосфорилазидом, где за этой реакцией без выделения следует термическая перегруппировка промежуточного соединения ацилазида (формулы  $Z^1-C(O)-N_3$ ) с получением in situ соединения формулы IIp, как определено в п.21, которое затем подвергают реакции с соединением формулы IIIp, как определено в п.21.

23. Способ получения соединения формулы VIIa, как определено в п.18, включающий реакцию соединения формулы IIbp



где  $LG^1$  является таким, как определено в п.14, а  $Z^{1p}$  является таким, как определено в п.21, с соединением формулы IIIp, как определено в п.21.

24. Способ получения соединения формулы VIIa, как определено в п.18, включающий реакцию соединения формулы VI, как определено в п.13, с соединением формулы VIIp



где  $Q^x$  определен в п.18.

