

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201690303** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2016.06.30

(51) Int. Cl. *C07D 495/04* (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2014.07.29

(54) **ПРОИЗВОДНЫЕ ТИЕНО[3,2-d]ПИРИМИДИНОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ
ИНФЕКЦИЙ**

(31) **13178534.7**

(32) **2013.07.30**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2014/066219**

(87) **WO 2015/014815 2015.02.05**

(71) Заявитель:

**ЯНССЕН САЙЕНСИЗ АЙРЛЭНД
ЮСи (IE)**

(72) Изобретатель:

**Мак Гоуен Дэвид Крейг, Рабуассон
Пьер Жан-Мари Бернар (BE)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к производным тиено[3,2-d]пиримидинов, способам их получения, фармацевтическим композициям и их применению в лечении вирусных инфекций.

A1

201690303

201690303

A1

**ПРОИЗВОДНЫЕ ТИЕНО[3,2-d]ПИРИМИДИНОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ
ИНФЕКЦИЙ**

Настоящее изобретение относится к производным тиено[3,2-d]пиримидина, способам их получения, фармацевтическим композициям и их применению в лечении вирусных инфекций.

Настоящее изобретение относится к применению производных тиено[3,2-d]пиримидина в лечении вирусных инфекций, иммунных или воспалительных расстройств, в которые вовлечены модуляция или агонизм толл-подобных рецепторов (TLR). Толл-подобные рецепторы представляют собой основные трансмембранные белки, характеризующиеся внеклеточным богатым лейцином доменом и цитоплазматическим расширением, которое содержит консервативную область. Врожденная иммунная система может распознавать патоген-ассоциированные молекулярные паттерны посредством данных TLR, экспрессируемых на клеточной поверхности определенных типов иммунных клеток. При распознавании чужеродных патогенов активируется выработка цитокинов и повышается экспрессия ко-стимулирующих молекул на фагоцитах. Это приводит к модуляции поведения Т-клеток.

Установлено, что большинство видов млекопитающих имеют от десяти до пятнадцати типов толл-подобных рецепторов. В общей сложности у людей и мышей выявили тринадцать TLR (под названием TLR1-TLR13), а у других видов млекопитающих обнаружили эквивалентные формы многих из них. Однако, эквиваленты определенных TLR, обнаруженных у человека, присутствуют не у всех млекопитающих. Например, ген, кодирующий белок, аналогичный TLR10 человека, присутствует у мыши, но, по-видимому, в некоторый момент времени в прошлом был поврежден ретровирусом. С другой стороны, у мыши экспрессируются TLR11, 12 и 13, ни один из которых не представлен у человека. У других млекопитающих могут экспрессироваться TLR, которые не обнаружены у человека. Другие виды, не являющиеся млекопитающими, могут иметь TLR, отличные от таковых млекопитающих, доказательством этому служит TLR14, обнаруженный у рыбы фугу рода *Takifugu*. Это может осложнить процедуру использования экспериментальных животных в

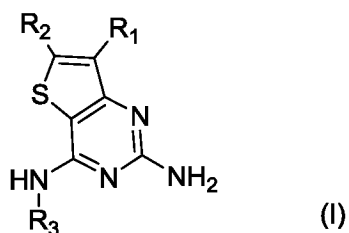
качестве моделей врожденного иммунитета человека.

Для обзора TLR смотри следующие статьи в журналах. Hoffmann, J.A., *Nature*, 426, p33-38, 2003; Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T., *Annual Rev. Immunology*, 21, p335-376, 2003; Ulevitch, R. J., *Nature Reviews: Immunology*, 4, p512-520, 2004.

Ранее были описаны соединения, проявляющие активность в отношении толл-подобных рецепторов, такие как производные пурина в WO 2006/117670, производные аденина в WO 98/01448 и WO 99/28321 и пиримидины в WO 2009/067081.

Тем не менее, существует острая потребность в новых модуляторах толл-подобных рецепторов, обладающих предпочтительной селективностью, более высокой эффективностью, а также улучшенным профилем безопасности по сравнению с соединениями из известного уровня техники.

В соответствии с настоящим изобретением предусмотрено соединение формулы (I),



или его фармацевтически приемлемая соль, таутомер(ы), стереоизомерные формы, сольват или полиморф, где

R₁ выбран из водорода, галогена, -CH₃ или -CF₃,

R₂ выбран из водорода, галогена, C₁₋₆ алкила или C₃₋₆ циклоалкила,

R₃ представляет собой C₁₋₈ алкил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, независимо выбранными из арила, арилокси, галогена, гидроксила, алкиламино, диалкиламино, C₁₋₆алкенила, C₁₋₆алкокси, карбоновой кислоты, сложного эфира карбоновой кислоты, амида карбоновой кислоты, нитрила, сульфонамида, сульфонамида, ацилсульфонамида или

R₃ представляет собой алкиларил необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, независимо выбранными из арила, арилокси, галогена, алкиламино, диалкиламино, C₁₋₆алкила, C₁₋₆алкенила, C₁₋₆алкокси, карбоновой кислоты, сложного эфира

карбоновой кислоты, амида карбоновой кислоты, нитрила, сульфонамида, сульфонамида или ацилсульфонамида.

Соединения формулы (I) и их фармацевтически приемлемые соли, таутомер(ы), стереоизомерные формы, сольват или полиморф обладают активностью фармацевтических препаратов, в частности, как модуляторы толл-подобных рецепторов 7 и 8 (в особенности TLR8).

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, таутомер, стереоизомерную форму, сольват или полиморф вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями, разбавителями или носителями.

Кроме того, соединение формулы (I), или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, таутомер, стереоизомерную форму или полиморф в соответствии с настоящим изобретением, или фармацевтическую композицию, содержащую указанное соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, таутомер, стереоизомерную форму или полиморф, можно применять в качестве лекарственного препарата.

Другим аспектом настоящего изобретения является то, что соединение формулы (I), или его фармацевтически приемлемую соль, его сольват, таутомер, стереоизомерную форму или полиморф, или указанную фармацевтическую композицию, содержащую указанное соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, таутомер, стереоизомерную форму или полиморф, можно соответственно применять в лечении нарушения, в которое вовлечена модуляция TLR7 и/или TLR8, предпочтительно TLR8.

Термин "(C₁₋₈)-алкил" и "(C₁₋₆)-алкил" относится к насыщенному алифатическому углеводороду с неразветвленной цепью, разветвленной цепью или циклическому насыщенному алифатическому углеводороду, содержащему определенное количество атомов углерода.

Термин "галоген" относится к фтору, хлору, бромю или йоду.

Термин "алкиларил" относится к насыщенному алифатическому углеводороду с неразветвленной цепью или разветвленной цепью,

содержащей определенное количество атомов углерода, замещенных арилом, где "арил" такой, как определено ниже.

Термин "алкенил" относится к алкилу, определенному выше и содержащему по меньшей мере два атома углерода и по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь.

Термин "циклоалкил" относится к карбоциклическому кольцу, содержащему определенное количество атомов углерода.

Термин "алкокси" относится к алкильной группе (цепи из атомов углерода и водорода), связанной одинарной связью с кислородом, как, например, метоксигруппе или этоксигруппе.

Термин "арил" означает ароматическую кольцевую структуру, необязательно содержащую один или два гетероатома, выбранных из N, O и S, в частности, из N и O. Указанная ароматическая кольцевая структура может содержать 5, 6 или 7 атомов в кольце. В частности, указанная ароматическая кольцевая структура может содержать 5 или 6 атомов в кольце.

Термин "арилокси" относится к ароматической кольцевой структуре. Указанная ароматическая группа связана одинарной связью с кислородом.

Как применяется в данном документе, любая химическая формула со связями, показанными только в виде сплошных линий, а не в виде сплошных клиновидных или пунктирных клиновидных связей или иным образом показанная как имеющая конкретную конфигурацию (например, *R*, *S*) вокруг одного или нескольких атомов, подразумевает каждый возможный стереоизомер или смесь двух, или более стереоизомеров.

Термины "стереоизомеры", "стереоизомерные формы" или "стереохимически изомерные формы" выше или ниже в настоящем документе применяются взаимозаменяемо.

Настоящее изобретение включает все стереоизомеры соединений по настоящему изобретению в виде чистого стереоизомера, либо в виде смеси двух или более стереоизомеров.

Энантиомеры представляют собой стереоизомеры, которые представляют собой не совпадающие при наложении зеркальные отражения друг друга. Смесь 1:1 пары энантиомеров представляет собой рацемат или рацемическую смесь.

Диастереомеры (или диастереоизомеры) представляют собой стереоизомеры, которые не являются энантиомерами, т. е. они не соотносятся как зеркальные отражения. Если соединение содержит двойную связь, то заместители могут находиться в E- или Z-конфигурации. Если соединение содержит по меньшей мере двузамещенную неароматическую циклическую группу, заместители могут находиться в цис- или транс-конфигурации.

Таким образом, настоящее изобретение включает энантиомеры, диастереомеры, рацематы, E-изомеры, Z-изомеры, цис-изомеры, транс-изомеры и их смеси во всех случаях, когда это возможно с химической точки зрения.

Значения всех этих выражений, т. е. энантиомеры, диастереомеры, рацематы, E-изомеры, Z-изомеры, цис-изомеры, транс-изомеры и их смеси, известны специалисту в данной области.

Абсолютную конфигурацию определяют согласно системе Кана-Ингольда-Прелога. Конфигурация при асимметричном атоме определяется как R или как S. Выделенные стереоизомеры, абсолютная конфигурация которых неизвестна, могут быть обозначены как (+) или (-) в зависимости от направления, в котором они вращают плоскость поляризации света. Например, выделенные энантиомеры, абсолютная конфигурация которых неизвестна, могут обозначаться как (+) или (-) в зависимости от направления, в котором они вращают плоскость поляризации света.

Если определяют конкретный стереоизомер, это означает, что указанный стереоизомер практически не содержит другие стереоизомеры, т. е. связан с менее чем 50%, предпочтительно с менее чем 20%, более предпочтительно с менее чем 10%, еще более предпочтительно с менее чем 5%, в частности, с менее чем 2% и наиболее предпочтительно с менее чем 1% таковых. Таким образом, если соединение формулы (I) указывают, например, как (R), это означает, что соединение практически не содержит изомер (S); если соединение формулы (I) указывают, например, как E, это означает, что соединение практически не содержит Z-изомер; если соединение формулы (I) указывают, например, как цис-, это означает, что соединение практически не содержит транс-изомер.

Фармацевтически приемлемые соли соединений формулы (I)

включают их соли присоединения кислоты и основные соли. Приемлемые соли присоединения кислоты образуются из кислот, которые образуют нетоксичные соли. Приемлемые основные соли образуются из оснований, которые образуют нетоксичные соли.

Соединения по настоящему изобретению также могут существовать в несольватированной и сольватированной формах. Термин "сольват" используется в данном документе для описания молекулярного комплекса, содержащего соединение в соответствии с настоящим изобретением и одну или несколько молекул фармацевтически приемлемого растворителя, например, этанола.

Термин "полиморф" относится к способности соединения в соответствии с настоящим изобретением существовать в более чем одной форме или кристаллической структуре.

Соединения по настоящему изобретению можно вводить в виде кристаллических или аморфных продуктов. Их можно получать, например, в виде твердой прессованной массы, порошков или пленок посредством таких способов, как осаждение, кристаллизация, сушка вымораживанием, сушка распылением или сушка выпариванием. Их можно вводить отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими соединениями по настоящему изобретению или в комбинации с одним или несколькими другими лекарственными средствами. Как правило, их будут вводить в виде состава в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями. Термин "наполнитель" используется в данном документе для описания любого ингредиента, отличного от соединения (соединений) по настоящему изобретению. Выбор наполнителя в большой степени зависит от таких факторов, как конкретный способ введения, влияние наполнителя на растворимость и стабильность и природа лекарственной формы.

Соединения по настоящему изобретению или любая их подгруппа могут быть составлены в различные фармацевтические формы для целей введения. В качестве подходящих композиций могут быть упомянуты все композиции, обычно применяемые для системного введения лекарственных средств. Для получения фармацевтических композиций по настоящему изобретению эффективное количество конкретного соединения, необязательно в форме соли

присоединения, в качестве активного ингредиента объединяют в однородную смесь с фармацевтически приемлемым носителем, при этом носитель может принимать самые разнообразные формы в зависимости от формы препарата, требуемой для введения. Данные фармацевтические композиции предпочтительно представлены в виде единичной лекарственной формы, подходящей, например, для перорального, ректального или чрескожного введения. Например, при получении композиций в виде пероральной лекарственной формы можно использовать любую общепринятую фармацевтическую среду, такую как, например, вода, гликоли, масла, спирты и т. п., в случае пероральных жидких препаратов, таких как суспензии, сиропы, эликсиры, эмульсии и растворы; или твердые носители, такие как крахмалы, сахара, каолин, разбавители, смазывающие вещества, связующие вещества, разрыхлители и т. п., в случае порошков, пилюль, капсул и таблеток. Вследствие простоты их введения таблетки и капсулы представляют собой наиболее предпочтительные формы единиц дозирования для перорального введения, в случае которых, как очевидно, применяют твердые фармацевтические носители. Также включены препараты в твердой форме, которые могут быть преобразованы непосредственно перед применением в жидкие формы. В композициях, приемлемых для чрескожного введения, носитель необязательно содержит средство, повышающее проницаемость, и/или приемлемое смачивающее средство, необязательно объединенное с приемлемыми добавками любой природы в минимальных пропорциях, при этом добавки не оказывают значительного вредного воздействия на кожу. Указанные добавки могут облегчать введение через кожу и/или могут быть полезными при получении необходимых композиций. Данные композиции можно вводить различными путями, например, в форме трансдермального пластыря, в форме точечного нанесения, в форме мази. Соединения по настоящему изобретению также можно вводить посредством ингаляции или инсуффляции с помощью способов и составов, применяемых в данной области для введения таким путем. Таким образом, в основном соединения по настоящему изобретению можно вводить в легкие в форме раствора, суспензии или сухого порошка.

Особенно предпочтительным является составление

вышеуказанных фармацевтических композиций в виде единичной лекарственной формы для простоты введения и равномерности дозирования. Единичная лекарственная форма, используемая в данном документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз, при этом каждая единица содержит предварительно установленное количество активного ингредиента, рассчитанное для получения требуемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Примерами таких единичных лекарственных форм являются таблетки (в том числе делимые или покрытые оболочкой таблетки), капсулы, пилюли, пакетики с порошком, пластинки, суппозитории, растворы или суспензии для инъекций и т. п., а также их отдельные множества.

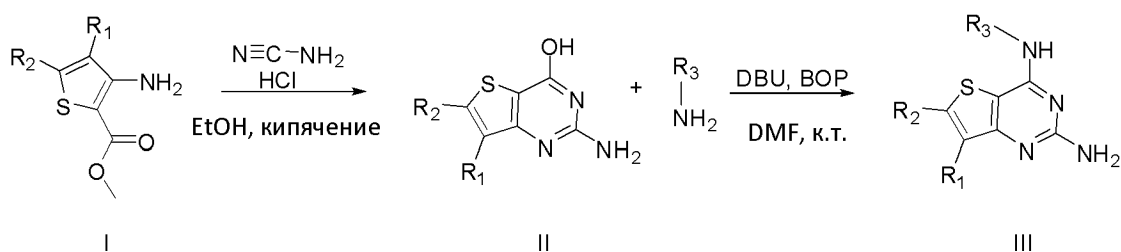
Специалисты в области лечения инфекционных заболеваний смогут определить эффективное количество, исходя из результатов тестов, представленных далее в данном документе. В целом, полагают, что эффективное суточное количество будет составлять от 0,01 мг/кг до 50 мг/кг массы тела, более предпочтительно от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг массы тела. Может быть целесообразным введение необходимой дозы в виде двух, трех, четырех или более частей дозы через соответствующие интервалы на протяжении дня. Указанные части дозы могут быть составлены в виде единичных лекарственных форм, например, содержащих 1-1000 мг и, в частности, 5-200 мг активного ингредиента на единичную лекарственную форму.

Точная дозировка и частота введения зависят от конкретного используемого соединения формулы (I), конкретного состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния, подлежащего лечению, возраста, веса и общего физического состояния конкретного пациента, а также другого медикаментозного лечения, которое может получать индивидуум, что хорошо известно специалистам в данной области. Более того, очевидно, что эффективное количество может быть снижено или увеличено в зависимости от реакции подвергнутого лечению субъекта и/или в зависимости от оценки врача, назначающего соединение по настоящему изобретению. Таким образом, вышеупомянутые диапазоны эффективного количества

являются только рекомендациями и не предназначены для ограничения в той или иной мере объема или применения настоящего изобретения.

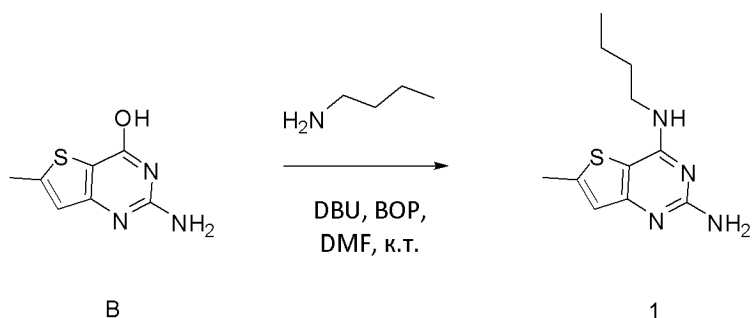
Получение соединений формулы (I)

Общая схема



Получение соединений типа **I** описано в литературе (Synthetic Communications, 9(8), p731-4, 1979; Synthetic Communications, 32(16), 2565-2568; 2002). 3-Аминотиофен-2-карбоксилаты смешивают с цианамидом в полярном растворителе (например, этаноле), содержащем кислоту (например, HCl) с образованием промежуточных соединений **II** при нагревании, как описано в литературе (Synthesis, (9), p1428, 2010). Промежуточное соединение **II** в полярном, апротонном растворителе можно смешивать с BOP или PyBOP в комбинации с основанием (например, DBU) и амином что ведет к образованию конечных продуктов (**III**) при комнатной температуре. Альтернативно, спирт в промежуточных соединениях типа **II** можно превращать в хлор с помощью описанных способов и хлорирующих средств, таких как POCl₃, часто с нагреванием, в присутствии растворителя и необязательно с основанием. После выделения, 4-хлоро промежуточное соединение можно затем использовать с образованием продуктов типа **III** при нагревании с амином в основании и полярном растворителе (например, ацетонитриле).

Получение 1

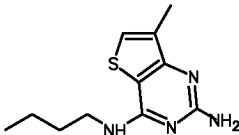
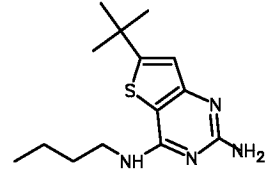
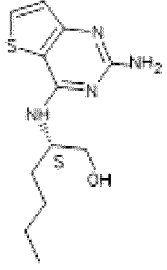


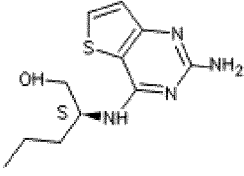
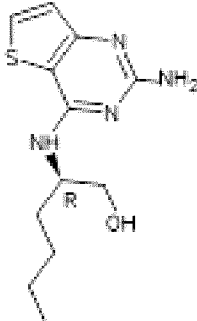
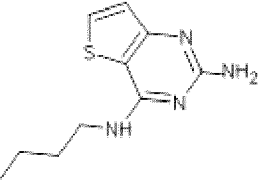
В 50 мл стеклянный сосуд помещали **В** (500 мг, 2,76 ммоль), безводный DMF (5 мл), DBU (1,26 г, 8,28 ммоль), *n*-бутиламина (605 мг, 8,3 ммоль) и BOP (1,46 г, 3,31 ммоль). Сосуд герметично закрывали и встряхивали в течение 16 часов при комнатной температуре. LC-MS показала полное превращение в продукт. Неочищенную реакцию смесь очищали препаративной HPLC (RP SunFire Prep C18 OBD-10 мкм, 30 × 150 мм, подвижная фаза 0,25% вод. карбонат аммония, до ацетонитрила). Лучшие фракции объединяли, и растворители удаляли при пониженном давлении с получением белого твердого вещества, **1**. LC-MS масса/заряд = 237 (M+H).

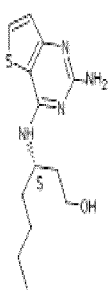
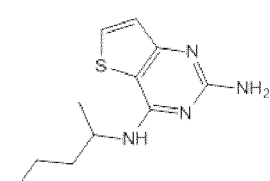
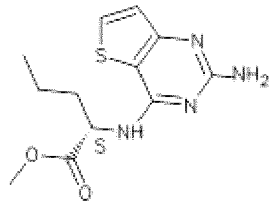
Таблица 1

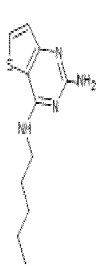
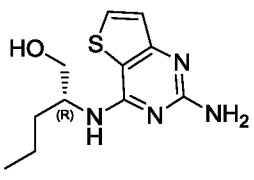
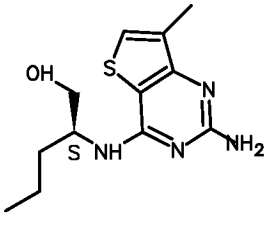
Соединения формулы (I) и соответствующие данные анализа. Соединения получали в соответствии со способами, описанными в экспериментальной части.

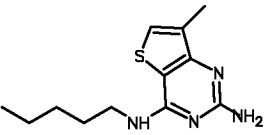
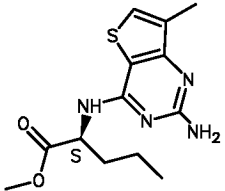
№	СТРУКТУРА	¹ H ЯМР	Способ LC, к.т. (минуты)	LC-MS Полученная масса (M+H)
1		¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 0,91 (т, J=7,4 Гц, 3H), 1,33 (дкв, J=14,9, 7,4 Гц, 2H), 1,49-1,61 (м, 2H), 3,35 (с, 3H), 3,36-3,42 (м, 2H), 5,74 (с, 2H), 6,69 (с, 1H),	А, 0,8	237

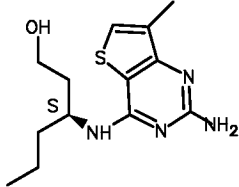
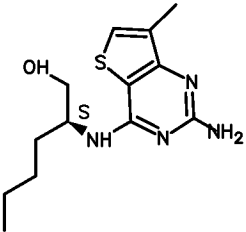
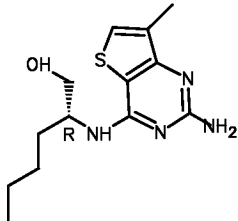
		7,03 (т, J=5,5 Гц, 1H)		
2		¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO-d ₆) δ ppm 0,91 (т, J=7,4 Гц, 3H), 1,26-1,42 (м, 2H), 1,48-1,62 (м, 2H), 2,17 (д, J=1,1 Гц, 3H), 3,37-3,46 (м, 2H), 5,83 (с, 2H), 7,14 (с, 1H), 7,43 (д, J=1,1 Гц, 1H)	B, 1,52	237
3		¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO-d ₆) δ ppm 0,90 (т, J=7,4 Гц, 3H), 1,27-1,35 (м, 2H), 1,36 (с, 9H), 1,47-1,60 (м, 2H), 3,35-3,43 (м, 2H), 5,72 (с, 2H), 6,73 (с, 1H), 7,04 (т, J=5,5 Гц, 1H)	B, 1,83	279
4		¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO-d ₆) δ ppm 0,85 (уш.с, 3H), 1,17-1,39 (м, 4H), 1,43-1,56 (м, 1H), 1,65 (уш. с, 1H), 3,39-3,54 (м, 2H), 4,26 (д, J=4,4 Гц, 1H), 4,65 (уш.с, 1H), 5,75 (с, 2H), 6,84 (д, J=8,4 Гц, 1H), 6,95 (д, J=5,3 Гц, 1H), 7,81 (д, J=5,3 Гц, 1H)	A, 0,70	267

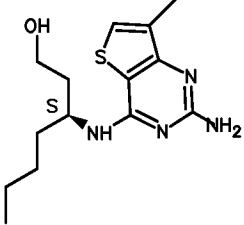
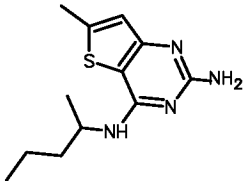
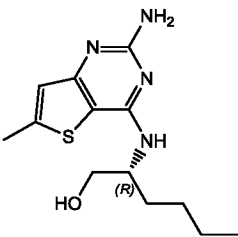
5		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ppm 0,78-0,94 (м, 3H), 1,16-1,41 (м, 2H), 1,45-1,69 (м, 2H), 3,47-3,53 (м, 1H), 4,30-4,47 (м, 2H), 7,18-7,28 (м, 1H), 7,77 (уш.с, 2H), 8,18 (д, $J=5,3$ Гц, 1H), 8,92 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 13,26 (уш.с, 1H)	А, 0,63	253
6		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ppm 0,84 (уш.с, 3H), 1,19-1,39 (м, 4H), 1,42-1,57 (м, 1H), 1,65 (уш.с, 1H), 3,37-3,55 (м, 2H), 3,71-4,21 (м, 1H), 4,28 (д, $J=4,6$ Гц, 1H), 5,97 (уш.с, 2H), 6,97 (д, $J=5,3$ Гц, 1H), 7,05 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,84 (д, $J=5,3$ Гц, 1H)	А, 0,70	267
7		^1H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ- d) δ ppm 0,98 (т, $J=7,4$ Гц, 3H), 1,39-1,51 (м, 2H), 1,61-1,69 (м, 2H), 1,74 (с, 1H), 3,59 (тд, $J=7,2, 5,7$ Гц, 2H), 4,71 (уш.с, 2H), 7,11 (д, $J=5,3$ Гц, 1H), 7,56 (д,	В, 0,71	223

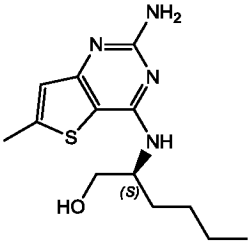
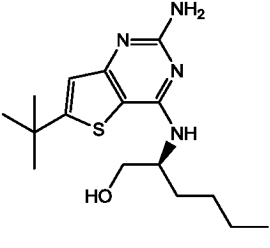
		$J=5,3$ Гц, 1H)		
8		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ppm 0,81-0,93 (м, 3H), 1,20-1,40 (м, 4H), 1,52-1,65 (м, 2H), 1,74 (кв, $J=6,6$ Гц, 2H), 3,40-3,50 (м, 2H), 4,38-4,52 (м, 2H), 7,22 (д, $J=5,5$ Гц, 1H), 7,63-7,82 (м, 2H), 8,18 (д, $J=5,5$ Гц, 1H), 8,82 (д, $J=8,4$ Гц, 1H)	A, 0,76	281
9		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ppm 0,89 (т, $J=7,3$ Гц, 3H), 1,16 (д, $J=6,6$ Гц, 3H), 1,26-1,38 (м, 2H), 1,39-1,51 (м, 1H), 1,53-1,64 (м, 1H), 4,28-4,39 (м, 1H), 5,77 (с, 2H), 6,95 (д, $J=5,3$ Гц, 1H), 7,01 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,81 (д, $J=5,3$ Гц, 1H)	A, 0,82	237
10		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ppm 0,84-0,98 (м, 3H), 1,27-1,51 (м, 2H), 1,57-1,70 (м, 1H), 1,80-1,98 (м, 1H), 3,69 (с, 3H), 4,76-4,92 (м, 1H), 7,27 (д,	A, 0,76	281

		$J=5,3$ Гц, 1H), 7,89 (уш.с, 2H), 8,26 (д, $J=5,3$ Гц, 1H), 9,47 (д, $J=7,3$ Гц, 1H)		
11		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ppm 0,87 (т, $J=6,9$ Гц, 3H), 1,25-1,37 (м, 4H), 1,57 (уш.с, 2H), 3,39-3,44 (м, 2H), 5,80 (с, 2H), 6,95 (д, $J=5,3$ Гц, 1H), 7,25 (с, 1H), 7,80 (д, $J=5,3$ Гц, 1H)	A, 0,84	237
12		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ppm 0,88 (т, $J=7,3$ Гц, 3H), 1,21-1,43 (м, 2H), 1,50 (дтд, $J=13,5$, 9,0, 9,0, 5,0 Гц, 1H), 1,57-1,69 (м, 1H), 3,38-3,53 (м, 2H), 4,29 (д, $J=4,6$ Гц, 1H), 4,62 (уш.с, 1H), 5,80 (с, 2H), 6,87 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 6,96 (д, $J=5,3$ Гц, 1H), 7,82 (д, $J=5,3$ Гц, 1H)	A, 0,61	253,1
13		^1H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ- d) δ ppm 0,95 (т, $J=7,3$ Гц, 3H), 1,32-1,50 (м, 2H), 1,51-1,71 (м, 2H), 2,31 (д, $J=1,1$	A, 0,67	267,1

		Гц, 3H), 3,34 (с, 1H), 3,67 (дд, J=11,0, 6,4 Гц, 1H), 3,83 (дд, J=11,0, 3,3 Гц, 1H), 4,19-4,38 (м, 1H), 4,77 (д, J=7,3 Гц, 1H), 4,87 (с, 2H), 7,19 (д, J=1,1 Гц, 1H)		
14		¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO-d ₆) δ ppm 0,80-0,94 (м, 3H), 1,20-1,39 (м, 4H), 1,49-1,64 (м, 2H), 2,17 (д, J=1,1 Гц, 3H), 3,36-3,43 (м, 2H), 5,82 (с, 2H), 7,15 (т, J=5,5 Гц, 1H), 7,43 (д, J=1,1 Гц, 1H)	В, 1,69	251,0
15		¹ H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ ppm 0,96 (т, J=7,4 Гц, 3H), 1,22-1,33 (м, 1H), 1,35-1,52 (м, 1H), 1,74-1,86 (м, 1H), 1,87-2,01 (м, 1H), 2,33 (д, J=1,1 Гц, 3H), 3,76 (с, 3H), 4,75 (уш.с, 2H), 4,97 (тд, J=7,5, 5,6 Гц, 1H), 5,10 (д, J=7,7 Гц, 1H), 7,22 (д, J=1,1 Гц, 1H)	Е, 1,02	295,2

16		^1H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ- <i>d</i>) δ ppm 0,92 (т, $J=7,4$ Гц, 3H), 1,26-1,50 (м, 3H), 1,51-1,66 (м, 2H), 1,68-1,79 (м, 1H), 1,86-2,03 (м, 1H), 2,32 (д, $J=1,1$ Гц, 3H), 3,45-3,68 (м, 2H), 4,41 (ддд, $J=11,1, 5,4, 2,9$ Гц, 1H), 4,52 (д, $J=8,8$ Гц, 1H), 4,97 (с, 2H), 7,20 (д, $J=1,1$ Гц, 1H)	A, 0,72	281,2
17			B, 1,38	281,1
18		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- <i>d</i> 6) δ ppm 0,85 (т, $J=6,5$ Гц, 3H), 1,11-1,35 (м, 4H), 1,38-1,56 (м, 1H), 1,57-1,74 (м, 1H), 2,18 (д, $J=0,9$ Гц, 3H), 3,39-3,55 (м, 2H), 4,19-4,35 (м, 1H), 4,66 (уш.с, 1H), 5,79 (с, 2H), 6,75 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,44 (д, $J=1,1$ Гц, 1H)	B, 1,41	281,1

19		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ppm 0,76-0,91 (м, 3H), 1,16-1,36 (м, 4H), 1,44-1,58 (м, 2H), 1,59-1,79 (м, 2H), 2,17 (д, $J=1,1$ Гц, 3H), 3,38-3,49 (м, 2H), 4,34 (д, $J=7,5$ Гц, 1H), 4,40 (т, $J=5,4$ Гц, 1H), 5,83 (с, 2H), 6,87 (д, $J=8,6$ Гц, 1H), 7,44 (д, $J=1,1$ Гц, 1H)	B, 1,49	295,1
20		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ppm 0,88 (т, $J=7,3$ Гц, 3H), 1,18 (д, $J=6,5$ Гц, 3H), 1,23-1,38 (м, 2H), 1,40-1,69 (м, 2H), 2,58 (с, 3H), 4,25-4,45 (м, 1H), 6,93 (с, 1H), 7,50 (уш.с, 2H), 8,50 (уш.с, 1H)	B, 1,66	251,1
21		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ppm 0,85 (т, $J=6,5$ Гц, 3H), 1,17-1,40 (м, 4H), 1,43-1,71 (м, 2H), 2,59 (с, 3H), 3,45-3,50 (м, 2H), 4,20-4,41 (м, 1H), 6,99 (д, $J=0,8$ Гц, 1H), 7,66 (уш.с, 2H), 8,71	D, 2,49	281,1

		(д, $J=8,5$ Гц, 1H), 13,00 (уш.с, 1H)		
22		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ppm 0,85 (т, $J=6,7$ Гц, 3H), 1,08-1,38 (м, 4H), 1,43-1,71 (м, 2H), 2,52 (уш.с, 2H), 2,57 (м, $J=1,0$ Гц, 3H), 4,29 (д, $J=5,0$ Гц, 1H), 4,82 (уш.с, 1H), 6,92 (д, $J=1,3$ Гц, 1H), 7,20 (уш.с, 2H), 8,22 (уш.с, 1H)	D, 2,67	281,1
23		^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ppm 0,85 (т, $J=6,8$ Гц, 3H), 1,16-1,35 (м, 4H), 1,40 (с, 9H), 1,51 (дд, $J=9,0, 4,8$ Гц, 1H), 1,64 (д, $J=6,0$ Гц, 1H), 3,47 (уш.с, 2H), 4,33 (д, $J=4,8$ Гц, 1H), 4,83 (уш.с, 1H), 7,00 (с, 1H), 7,67 (уш.с, 2H), 8,66 (д, $J=8,5$ Гц, 1H)	C, 2,67	323,1

Аналитические способы

Общая информация: измерения в ходе LC осуществляли с использованием системы Acquity UPLC (Waters), содержащей насос для двухкомпонентных смесей, поддон для образцов, нагреватель колонки (установленный на 55°C), детектор на диодной матрице (DAD) и колонку, как указано в соответствующих способах ниже. Поток из колонки разделяли для MS-спектрометра. MS-детектор

оснащали источником ионизации электрораспылением. Масс-спектры получали путем сканирования от 100 до 1000 за 0,18 секунды с применением времени выдержки 0,02 секунды. Напряжение на капиллярной игле составляло 3,5 кВ, и температуру источника поддерживали при 140°C. В качестве газа-распылителя применяли азот.

Способы LC-MS

Код способа LC-MS	Колонка	Подвижная фаза	Градиент	Поток (мл/мин) /Темп. (°C)	Время анализа за (мин)
А	Waters : BEH C18 (1,7 мкм, 2,1 × 50 мм)	А: 10 мМ CH ₃ COONH ₄ в 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CNВ: CH ₃ CN	От 95% А до 5% А за 1,3 мин., выдерживание в течение 0,7 мин.	0,8/55	2
В	Waters : HSS T3 (1,8 мкм, 2,1 × 100 мм)	А: 10 мМ CH ₃ COONH ₄ в 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN В: CH ₃ CN	От 100% А до 5% А за 2,10 мин., до 0% А за 0,90 мин., до 5% А за 0,5 мин.	0,8/55	3,5
С	Agilent: ТС-C18 (5 мкм, 2,1×50 мм)	А: CF ₃ COOH 0,1% в воде, В: CF ₃ COOH 0,05% в CH ₃ CN	100% А в течение 1 мин., до 40% А за 4 мин., до 15% А за 2,5 мин., до 100% А за 2 мин.	0,8/50	10,5
Д	Agilent: ТС-C18 (5 мкм, 2,1×50 мм)	А: CF ₃ COOH 0,1% в воде, В: CF ₃ COOH 0,05% в CH ₃ CN	90% А в течение 0,8 мин, до 20% А за 3,7 мин, выдерживание в течение 3 мин, обратно	0,8/50	10,5

			к 90% А за 2 мин.		
Е	Waters : ВЕН С18 (1,7 мкм, 2,1*50 мм)	А: 10 мМ CH ₃ COONH ₄ в 90% Н ₂ О + 10% CH ₃ CN В: MeOH	От 95% А до 5% А в течение 1,3 мин., выдерживание в течение 0,2 мин., до 95% А в течение 0,2 мин., выдерживание в течение 0,1 мин.	0,7/70	1,8

Биологическая активность соединений формулы (I)

Описание биологических анализов

Оценка активности TLR7 и TLR8

Способность соединений активировать TLR7 и/или TLR8 человека оценивали в клеточном анализе репортерного гена с использованием клеток HEK293, временно трансфицированных вектором экспрессии TLR7 или TLR8 и репортерной конструкцией NFκB-luc.

Вкратце, клетки HEK293 выращивали в культуральной среде (DMEM, дополненной 10% FCS и 2 мМ глутамина). Для трансфекции клеток в 15 см чашках клетки отделяли трипсином-EDTA, трансфицировали смесью плазмиды CMV-TLR7 или TLR8 (1700 нг), плазмиды NFκB-luc (850 нг) и трансфекционного реагента и инкубировали в течение 48 ч. при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Трансфицированные клетки затем отмывали в PBS, отделяли трипсином-EDTA и ресуспендировали в среде с плотностью 1,25 x 10⁵ клеток/мл. Сорок микролитров клеток затем распределяли в каждую лунку в 384-луночных планшетах, где уже содержалось 200 нл соединения в 100% DMSO. После 6 часов инкубации при 37°C, 5% CO₂, определяли люциферазную активность, путем добавления в каждую лунку 15 мкл субстрата Steady Lite Plus (Perkin Elmer) и

выполняли считывание показаний на устройстве для визуализации микропланшетов ViewLux ultraNTS (Perkin Elmer). Кривые зависимости доза-эффект строили на основе измерений, выполненных в четырех повторах. Для каждого соединения определяли значения наиболее низких эффективных концентраций (LEC), определяемых как концентрация, которая индуцирует эффект, который по меньшей мере в два раза превышает стандартное отклонение анализа.

Токсичность соединений определяли параллельно в 384-луночных планшетах с использованием аналогичной серии разведений соединения с клетками, трансфицированными только конструкцией CMV-TLR7 ($1,25 \times 10^5$ клеток/мл), из расчета 40 мкл на лунку. Жизнеспособность клеток измеряли после 6 часов инкубации при 37°C, 5% CO₂, путем добавления 15 мкл ATP lite (Perkin Elmer) на лунку и считывания показаний на устройстве для визуализации микропланшетов ViewLux ultraNTS (Perkin Elmer). Данные регистрировали в виде CC₅₀.

Параллельно использовали аналогичные серии разведения соединения (200 нл соединения в 100% DMSO) с клетками, трансфицированными только репортерной конструкцией NFκB-luc ($1,25 \times 10^5$ клеток/мл), из расчета 40 мкл на лунку. Через шесть часов после инкубации при 37°C, 5% CO₂, определяли люциферазную активность путем добавления 15 мкл субстрата Steady Lite Plus (Perkin Elmer) в каждую лунку и выполняли считывание показаний на устройстве для визуализации микропланшетов ViewLux ultraNTS (Perkin Elmer). Данные обратного скрининга отмечали в виде LEC.

Активация промоторных элементов ISRE

Способность соединений индуцировать IFN-I также оценивали посредством определения активации интерферон-зависимых регуляторных элементов (ISRE) при использовании кондиционированных сред от PBMC. Элемент ISRE с последовательностью GAAACTGAACT высокочувствителен к фактору транскрипции STAT1-STAT2-IRF9, активируемому после связывания IFN-I с его рецептором IFNAR (Clontech, PT3372-5W). Плазмида pISRE-Luc от Clontech (№ по кат. 631913) содержит 5 копий данного элемента ISRE, за которыми следует ORF люциферазы

светлячка. Получали клеточную линию HEK293, стабильно трансфицированную pISRE-Luc (HEK-ISREluc), для анализа кондиционированных сред клеточной культуры PBMC.

Вкратце, PBMC получали из лейкоцитарных пленок по меньшей мере двух доноров с применением стандартного протокола центрифугирования с фиколлом. Выделенные PBMC ресуспендировали в среде RPMI, дополненной 10% сыворотки АВ человека, и 2×10^5 клеток/лунку распределяли в 384-луночных планшетах, содержащих соединения (общий объем 70 мкл). После инкубации в течение ночи 10 мкл, надосадочной жидкости переносили в 384-луночные планшеты, содержащие 5×10^3 клеток HEK-ISREluc/лунка в 30 мкл (высеянных за день до этого). После 24 часов инкубации, активацию элементов ISRE измеряли посредством проведения анализа люциферазной активности с использованием 40 мкл/лунка субстрата Steady Lite Plus (Perkin Elmer) и измеряли с помощью устройства для визуализации микропланшетов ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Стимулирующую активность каждого соединения в отношении клеток HEK-ISREluc отмечали в виде величины LEC, определяемой как концентрация соединения, применяемая по отношению к PBMC, которая приводит к люциферазной активности, превышающей по меньшей мере в два раза стандартное отклонение анализа. LEC, в свою очередь, указывает на степень активации ISRE при переносе определенного количества культуральной среды PBMC. Рекомбинантный интерферон α -2a (Roferon-A) использовали в качестве стандартного контрольного соединения.

Таблица 2

Биологическая активность соединений формулы (I)

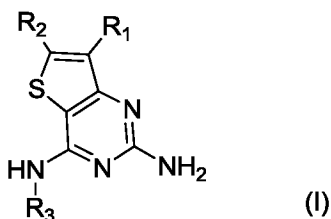
№	TLR7 человека (LEC), мкМ	TLR8 человека (LEC), мкМ	HEK-ISRE luc (LEC), мкМ
1	1,0	0,5	0,1
2	2,2	1,0	0,6
3	1,2	1,2	0,4
4	0,5	0,03	0,04
5	2,7	0,2	0,4
6	>25	0,5	0,6

7	1,1	0,7	0,3
8	1,2	0,7	0,3
9	3,3	2,5	3,8
10	6,1	2,7	0,8
11	2,1	3,9	1,2
12	>25	7,2	21
13	12	0,2	0,6
14	6,8	1,9	3,2
15	>25	3,5	2,6
16	5,2	1,6	0,7
17	3,7	0,3	0,4
18	>25	0,8	1,7
19	3,9	1,6	0,6
20	>25	6,9	10,1
21	10,4	0,6	-
22	2,9	0,2	-
23	2,7	2,6	-

Все соединения показали отсутствие активности (ЛЕС >25 мкМ) в анализе обратного скрининга на НЕК 293 NF-кВ, описанном выше.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I),



или его фармацевтически приемлемая соль, таутомер(ы), стереоизомерная форма, сольват или полиморф, где

R_1 выбран из водорода, галогена, $-CH_3$ или $-CF_3$,

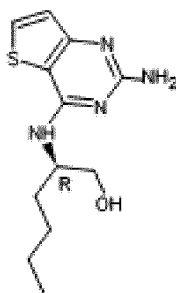
R_2 выбран из водорода, галогена, C_{1-6} алкила или C_3-6 циклоалкила,

R_3 представляет собой C_{1-8} алкил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, независимо выбранными из арила, арилокси, галогена, гидроксила, алкиламино, диалкиламино, C_{1-6} алкенила, C_{1-6} алкокси, карбоновой кислоты, сложного эфира карбоновой кислоты, амида карбоновой кислоты, нитрила, сульфонамида, сульфонамида, ацилсульфонамида или

R_3 представляет собой алкиларил необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, независимо выбранными из арила, арилокси, галогена, алкиламино, диалкиламино, C_{1-6} алкила, C_{1-6} алкенила, C_{1-6} алкокси, карбоновой кислоты, сложного эфира карбоновой кислоты, амида карбоновой кислоты, нитрила, сульфонамида, сульфонамида или ацилсульфонамида.

2. Соединение по п. 1, где оба R_1 и R_2 представляют собой водород, и где R_3 представляет собой C_{1-8} алкил, замещенный гидроксилом.

3. Соединение по п. 2, имеющее структуру



4. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение

формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, таутомер(ы), стереоизомерные формы, сольват или полиморф по п. 1 вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями, разбавителями или носителями.

5. Соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, таутомер(ы), стереоизомерные формы, сольват или полиморф по п. 1 или фармацевтическая композиция по п. 4 для применения в качестве лекарственного средства.

6. Соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, таутомер(ы), стереоизомерные формы, сольват или полиморф по п. 1 или фармацевтическая композиция по п. 4 для применения при лечении нарушения, в которое вовлечена модуляция TLR7 и/или TLR8, предпочтительно TLR8.

По доверенности