

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 046473

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.03.19

(21) Номер заявки
202292117

(22) Дата подачи заявки
2021.02.05

(51) Int. Cl. C07D 487/04 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)

(54) СОЕДИНЕНИЯ 7-(МЕТИЛАМИНО)ПИРАЗОЛО[1,5-a]ПИРИМИДИН-3-КАРБОКСАМИДА

(31) 62/975,257

(32) 2020.02.12

(33) US

(43) 2023.02.08

(86) PCT/US2021/016737

(87) WO 2021/162942 2021.08.19

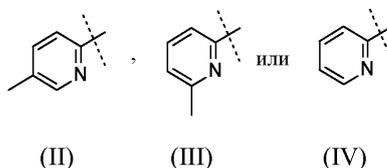
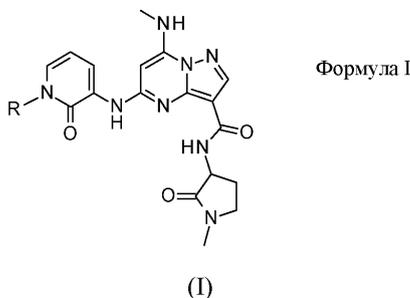
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(56) WO-A1-2019023468
WO-A1-2020123225
WO-A1-2020055636

(72) Изобретатель:
Блэйш Томас Джон, Чэнь Чжаогэнь,
Джессоп Теодор Кёртис (US)

(74) Представитель:
Гизатуллин Ш.Ф., Христофоров А.А.,
Угрюмов В.М., Прищепный С.В.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Джермакян Р.В.
(RU)

(57) В настоящем изобретении предложено соединение формулы I, где R представляет собой (II), (III) или (IV), или его фармацевтически приемлемая соль, подходящая для применения в лечении псориаза, системной красной волчанки или диабета 1 типа.



B1

046473

046473

B1

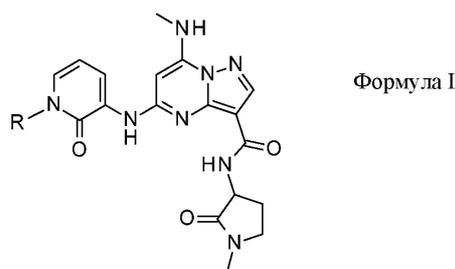
Настоящее изобретение относится к новым соединениям, которые связываются с псевдокиназным доменом (JH2) TYK2 и ингибируют передачу сигналов определенных цитокинов, в частности передачу сигналов IL-23 и IFN α , к фармацевтическим композициям, содержащим указанные соединения, к способам применения указанных соединений для лечения определенных аутоиммунных заболеваний, и к промежуточным соединениям и способам, подходящим для синтеза указанных соединений.

Считается, что псориаз и другие аутоиммунные заболевания, такие как диабет, опосредованы передачей сигналов TYK2 некоторых провоспалительных цитокинов (см., например, J.S.Tokarski, et al., J. Biol. Chem., том 290(17), стр. 11061-11074 (2015) и L.Marroqui, et al., Diabetes, том 64, стр. 3808-3817 (2015)). Псориаз представляет собой хроническое кожное заболевание, которым, по оценкам, поражено примерно 2% населения в целом. Варианты лечения псориаза включают, например, местное лечение, такое как кортикостероиды, фототерапию, такую как ультрафиолетовое излучение спектра В (UVB), и системное лечение, такое как метотрексат и апремиласт. К сожалению, такие агенты не всегда обеспечивают эффективное лечение и могут быть связаны с различными неблагоприятными побочными эффектами.

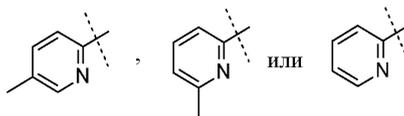
В заявке US 2019/0031664 A1 раскрыты некоторые замещенные пиразоло[1,5-а]пиримидины, подходящие для лечения различных воспалительных и аутоиммунных заболеваний посредством ингибирования TYK2. В патенте США № 7557110 описаны некоторые производные пиразоло[1,5-а]пиримидина в качестве ингибиторов киназы, подходящих для лечения опосредованных киназой нарушений, таких как воспалительные заболевания и аутоиммунные заболевания.

Существует потребность в альтернативном лечении аутоиммунных заболеваний, таких как псориаз, системная красная волчанка (СКВ) и диабет. В частности, существует потребность в соединениях, которые связываются с доменом TYK2 JH2. Кроме того, существует потребность в соединениях, которые связываются с доменом JH2 TYK2 и ингибируют передачу сигналов IL-23 и IFN α .

Соответственно, в одном варианте реализации настоящего изобретения предложено соединение формулы I

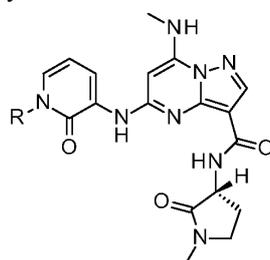


где R представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

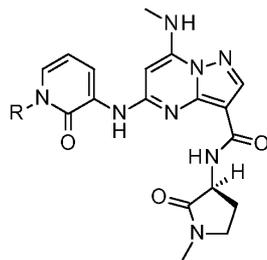
В конкретном варианте реализации указанное соединение имеет формулу Ia



Формула Ia

или его фармацевтически приемлемая соль.

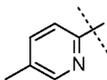
В конкретном варианте реализации указанное соединение имеет формулу Ib



Формула Ib

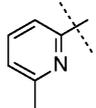
или его фармацевтически приемлемая соль.

В одном варианте реализации R представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте реализации R представляет собой



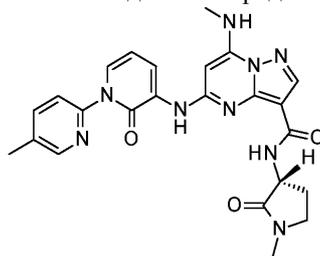
или его фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте реализации R представляет собой



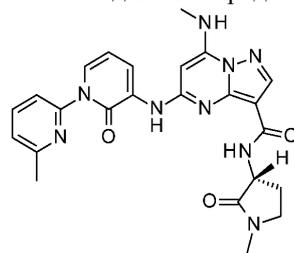
или его фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте реализации указанное соединение представляет собой



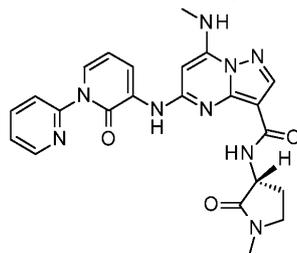
или его фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте реализации указанное соединение представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте реализации указанное соединение представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте реализации настоящего изобретения также предложен способ лечения псориаза у пациента, нуждающегося в таком лечении, причем указанный способ включает введение пациенту эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. В одном ва-

рианте реализации настоящего изобретения также предложен способ лечения СКВ у пациента, нуждающегося в таком лечении, причем указанный способ включает введение пациенту эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте реализации настоящего изобретения дополнительно предложен способ лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита, болезни Крона, псориатического артрита, ревматоидного артрита (РА), очаговой алопеции, атопического дерматита, аксиального спондилоартрита, рассеянного склероза (РС), диабета 1 типа, диабета 2 типа и латентного аутоиммунного диабета у взрослых (latent autoimmune diabetes of adults, LADA) у пациента, нуждающегося в таком лечении, причем указанный способ включает введение пациенту эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте реализации настоящего изобретения дополнительно предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии. В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении псориаза. В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении СКВ. В одном варианте реализации настоящего изобретения также предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении заболевания, выбранного из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита, болезни Крона, псориатического артрита, РА, очаговой алопеции, атопического дерматита, аксиального спондилоартрита, РС, диабета 1 типа, диабета 2 типа и LADA.

В одном варианте реализации настоящего изобретения также предложено применение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения псориаза. В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено применение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения СКВ. В одном варианте реализации настоящего изобретения также предложено применение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита, болезни Крона, псориатического артрита, РА, очаговой алопеции, атопического дерматита, аксиального спондилоартрита, РС, диабета 1 типа, диабета 2 типа и LADA.

В одном варианте реализации настоящего изобретения дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль, с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. В одном варианте реализации настоящего изобретения дополнительно предложен способ получения фармацевтической композиции, включающий смешивание соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. В одном варианте реализации настоящего изобретения также включает новые промежуточные соединения и способы синтеза соединений формулы I.

Используемые в данном документе термины "лечащий", "лечение" или "лечить" включают ограничение, замедление, остановку или обращение прогрессирования или тяжести существующего симптома или нарушения.

Используемый в данном документе термин "пациент" относится к млекопитающему, в частности, человеку.

Используемый в данном документе термин "эффективное количество" относится к количеству или дозе соединения согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли, которое при однократном или многократном введении его дозы пациенту обеспечивает требуемый эффект у пациента, подлежащего диагностике или лечению.

Эффективное количество может быть установлено специалистом в данной области техники посредством применения известных способов и наблюдения за результатами, полученными при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного для пациента количества наблюдающий врач-диагностик учитывает множество факторов, включая, но не ограничиваясь ими: биологический вид пациента; его размер, возраст и общее состояние здоровья; конкретное вовлеченное заболевание или нарушение; степень вовлеченности в патологический процесс или тяжесть заболевания или нарушения; реакция отдельного пациента; конкретное введенное соединение; способ введения; характеристики биодоступности введенного препарата; выбранная схема лечения; применение сопутствующих лекарственных препаратов; и другие релевантные обстоятельства.

Соединения согласно настоящему изобретению составляют в фармацевтические композиции, которые вводят любым способом, обеспечивающим биодоступность соединения. Наиболее предпочтительно, такие композиции предназначены для перорального введения. Такие фармацевтические композиции и способы их получения хорошо известны в данной области (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, редактор L.V. Allen, 22-е издание, Pharmaceutical Press, 2012).

Соединения формулы I или их фармацевтически приемлемая соль наиболее подходят для применения в способах лечения согласно настоящему изобретению, при этом все конфигурации, включая энан-

тиомеры и их смеси, включая рацематы, входят в объем настоящего изобретения. Следует понимать, что указанные конфигурации применимы как к способам лечения, так и к соединениям согласно настоящему изобретению.

Конкретные промежуточные соединения, описанные в последующих примерах получения, могут содержать одну или более азотных защитных групп. Следует понимать, что защитные группы могут быть различными, что известно специалистам в данной области техники, в зависимости от конкретных реакционных условий и конкретных проводимых превращений. Условия введения и удаления защитных групп известны специалистам в данной области техники и описаны в литературе (см., например, "Greene's Protective Groups in Organic Synthesis", четвертое издание, авторы Peter G.M. Wuts и Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2007).

Отдельные изомеры, включая энантиомеры, могут быть отделены или разделены специалистом в данной области в любой удобный момент синтеза соединений согласно настоящему изобретению такими способами, как методики селективной кристаллизации или хиральная хроматография (см., например, J. Jacques et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, и E.L. Eliel и S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994).

Фармацевтически приемлемая соль соединения согласно настоящему изобретению может быть образована, например, с помощью реакции между подходящим свободным основанием соединения согласно настоящему изобретению и подходящей фармацевтически приемлемой кислотой в подходящем растворителе, таком как диэтиловый эфир, при стандартных условиях, известных в данной области техники. Кроме того, образование таких фармацевтически приемлемых солей может происходить одновременно со снятием азотных защитных групп. См., например, Gould, P.L., "Salt selection for basic drugs," International Journal of Pharmaceutics, 33: 201-217 (1986); Bastin, R.J., et al. "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities," Organic Process Research and Development, 4: 427-435 (2000); и Berge, S.M., et al., "Pharmaceutical Salts," Journal of Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19, (1977).

Определенные сокращения расшифровываются следующим образом: "BINAP" относится к (\pm)-2,2'-бис(дифенилфосфино)-1,1'-бинафталину; "BOP" относится к гексафторфосфату (бензотриазол-1-илокси)трис(диметиламино)фосфония; "BrettPhos" относится к дициклогексил[3,6-диметокси-2',4',6'-трис(1-метилэтил)][1,1'-бифенил]-2-ил]фосфину; "ДХМ" относится к дихлорметану; "DEM" относится к диэтилмалонату; "ДИЭА" относится к N,N-диизопропилэтиламину; "DMEM" относится к модифицированной Дульбекко среде Игла; "ДМФА" относится к N,N-диметилформамиду; "ДМСО" относится к диметилсульфоксиду; "EtOAc" относится к этилацетату; "EtOH" относится к этанолу и этиловому спирту; "ФБС" относится к фетальной бычьей сыворотке; "НАТУ" относится к гексафторфосфату 1-[бис(диметиламино)метиле]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиний-3-оксида; "HEPES" относится к 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоте; "ВЭЖХ" относится к высокоэффективной жидкостной хроматографии; "IFN α " относится к альфа-интерферону; "IL-2" относится к интерлейкину 2; "IL-23" относится к интерлейкину 23; "JAK" относится к янус-киназе; "LiHMDS" относится к гексаметилдизилазиду лития; "MeI" относится к йодистому метилу; "MeNH₂" относится к метиламину; "MeOH" относится к метанолу и метиловому спирту; "MTBE" относится к метил-трет-бутиловому эфиру; "NaOEt" относится к этоксиду натрия; "Pd-175 [tBuBrettPhos Pd(аллил)]OTf" относится к трифлату аллил(2-дигрет-бутилфосфино-3,6-диметокси-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил)палладия(II); "RPM" относится к оборотам в минуту; "RPMI" относится к Мемориальному институту Розуэлл Парк; "ТЭА" относится к триэтиламину; "ТГФ" относится к тетрагидрофурану; "ТΥК2" относится к тирозинкиназе 2; "UVB" относится к ультрафиолетовому излучению В; и "STAT" относится к преобразователю сигнала и активатору белка транскрипции.

Соединения согласно настоящему изобретению или их фармацевтически приемлемые соли получают с помощью множества методик, известных средним специалистам в данной области техники, причем некоторые из указанных методик представлены ниже на схемах, в примерах получения и примерах. Продукты каждой стадии на приведенных ниже схемах могут быть выделены традиционными методами, хорошо известными в данной области техники, включая экстракцию, упаривание, осаждение, хроматографию, фильтрование, растирание в порошок и кристаллизацию. На следующих ниже схемах все заместители, если не указано иное, являются такими, как определено ранее. Реагенты и исходные вещества общедоступны средним специалистам в данной области техники. Без ограничения объема настоящего изобретения, следующие схемы, примеры получения и примеры представлены для дополнительной иллюстрации настоящего изобретения.

На схеме 3, стадия А, показано добавление DEM к соединению (8) и последующая циклизация до соединения (9) с использованием подходящего основания, такого как NaOEt или трет-бутоксид калия, при температуре около 80°C в растворителе, таком как EtOH.

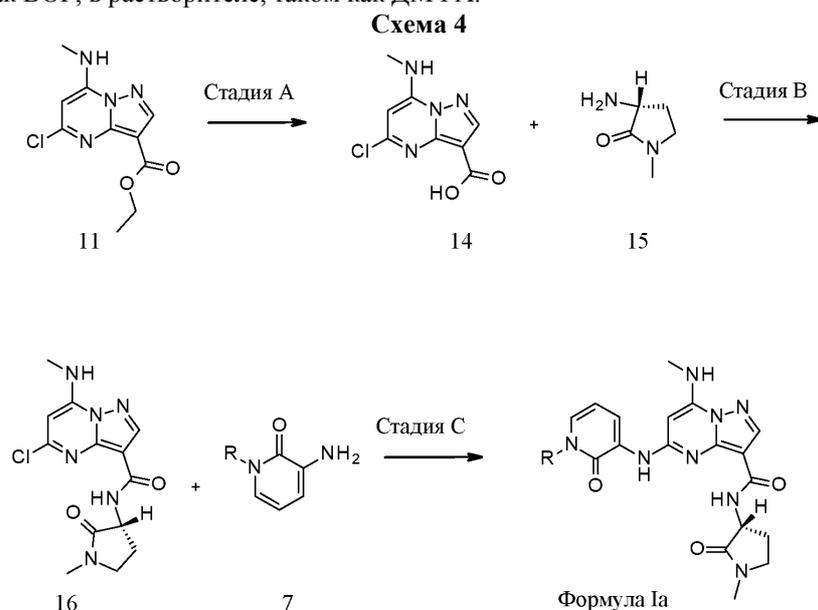
На стадии В 7-гидрокси- и 5-оксогруппы соединения (9) могут быть хлорированы с использованием подходящего источника хлора, такого как POCl₃, и подходящего органического основания, такого как пиридин, при температуре около 50-100°C в подходящем растворителе, таком как ацетонитрил, с получением соединения (10).

На стадии С селективное нуклеофильное ароматическое замещение 7-хлоргруппы соединения (10) может быть осуществлено в условиях, хорошо известных в данной области, с использованием соответствующего нуклеофила, такого как MeNH₂, в подходящем растворителе, таком как ТГФ, при температуре окружающей среды с получением соединения (11).

На стадии D может быть проведена реакция Бухвальда между соединением (11) и соединением (7) с образованием соединения (12) с использованием подходящего катализатора и системы лигандов, такой как Pd-175 [tBuBrettPhos Pd(аллил)]OTf с подходящим основанием, таким как ацетат калия, в подходящем растворителе, таком как 2-метил-2-бутанол, при нагревании до 100°C.

Соединение (12) можно обработать подходящим основанием, таким как водный раствор LiOH, в подходящей системе растворителей, такой как EtOH и ТГФ, при нагревании с обратным холодильником с получением соединения (13) посредством основного гидролиза сложного эфира, как показано на стадии E.

На стадии F показано образование соединения формулы Ia посредством амидного сочетания в условиях, хорошо известных в данной области техники, между соединением (13) и соединением (4) с использованием подходящего органического основания, такого как DIEA, и подходящего связующего агента, такого как BOP, в растворителе, таком как ДМФА.



На схеме 4, стадия А, показан щелочной гидролиз соединения (11) с подходящим основанием, таким как водный раствор NaOH, в растворителе, таком как 1,4-диоксан, при 50°C с получением соединения (14).

На стадии В показано амидное сочетание соединений (14) и (15) с использованием условий, в целом описанных на схеме 3, стадия F, с получением соединения (16).

На стадии С может быть проведена реакция Бухвальда между соединениями (16) и (7) с использованием подходящего катализатора и системы лигандов, такой как Pd-175 [tBuBrettPhos Pd(аллил)]OTf или димер хлорида аллилпалладия (II), и BINAP с подходящим основанием, таким как ацетат калия, в подходящей системе растворителей, такой как 1,4-диоксан и 2-метил-2-бутанол, при нагревании до 120-140°C с получением соединения формулы Ia.

Пример получения 1.

трет-Бутил-N-[(1R)-1-(метилкарбамоил)-3-метилсульфанилпропил]карбамат

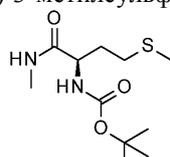


Схема 1, стадия А: раствор (трет-бутоксикарбонил)-D-метионина (400 г, 1,6 моль), гидрохлорида

метиламина (162,47 г, 2,4 моль) и ДИЭА (700 мл, 4,01 моль) в ДМФА (4 л) охлаждают до 0°C и добавляют НАТУ (732,1 г, 1,92 моль). Реакционную смесь нагревают до температуры окружающей среды. После 2-часового перемешивания растворитель выпаривают. Затем добавляют воду (10 л), и водный раствор экстрагируют ДХМ (2×3 л). Органические слои объединяют, промывают насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (3 л), сушат над сульфатом натрия и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на силикагеле, элюируя EtOAc в гексане, с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (368 г, 87%). ЭР/МС m/z 263 (M+H).

Пример получения 2.

трет-бутил-N-[(3R)-1-метил-2-оксопирролидин-3-ил]карбамат

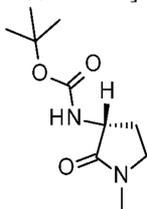


Схема 1, стадия В: смесь трет-бутил-N-[(1R)-1-(метилкарбамоил)-3-метилсульфанилпропил]карбамата (368 г, 1,40 моль) и MeI (3,68 л, 59,11 моль) перемешивают при температуре окружающей среды в течение 18 ч. Затем смесь концентрируют в вакууме. Часть полученной неочищенной йодидной соли диметилсульфония (210 г, 0,52 моль) растворяют в ТГФ (4,7 л), охлаждают до 0°C в атмосфере азота и по каплям добавляют LiHMDS (1,00M раствор в ТГФ, 1,16 л, 1,16 моль). Затем реакционную смесь нагревают до температуры окружающей среды. Через 4 ч добавляют воду (2,4 л), и растворитель концентрируют до половины объема. Смесь экстрагируют ДХМ (2×3 л). Органические вещества объединяют и концентрируют в вакууме. Остаток очищают хроматографией на силикагеле, элюируя MeOH в ДХМ, с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (50 г). ЭР/МС m/z 215 (M+H). Хиральная ВЭЖХ: Rt (время удерживания) = 9,13 мин; ЖХ- колонка: ChiralPAC IA OD 4,6×250 мм 5 мкм; изократический: 0,1% диэтиламин/гексан/этанол (85/15); температура колонки: 25°C; скорость потока: 1,0 мл/мин.

Оптическое вращение: $[\alpha]_D^{20} = +53^\circ$ (C=0,5, MeOH).

Пример получения 3.

(3R)-3-Амино-1-метилпирролидин-2-он; 4-метилбензолсульфоновая кислота

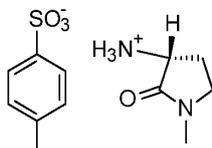


Схема 1, стадия С: смесь трет-бутил-N-[(3R)-1-метил-2-оксопирролидин-3-ил]карбамата (46 г, 214,69 ммоль) и 4-метилбензолсульфоновой кислоты (74,5 г, 433 ммоль) в ацетонитриле (500 мл) нагревают до 55°C и перемешивают в течение 4 ч. Затем добавляют МТБЭ (1 л), и смесь охлаждают до 22°C. Полученное твердое вещество собирают путем фильтрации, промывают дополнительным количеством МТБЭ и сушат в вакууме до постоянной массы, получая указанное в заголовке соединение в виде белого твердого вещества (60 г, 95%). ЭР/МС m/z 115 (M+H). Оптическое вращение: $[\alpha]_D^{20} = +31,3^\circ$ (C=0,5, MeOH).

Пример получения 4.

Бензил-N-[1-(5-метил-2-пиридил)-2-оксо-3-пиридил]карбамат

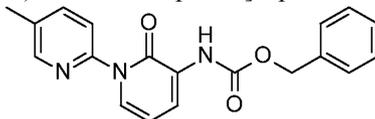


Схема 2, стадия А: в сосуд высокого давления загружают бензил-N-(2-оксо-1H-пиридин-3-ил)карбамат (6 г, 24 ммоль), иодид меди (0,9 г, 5 ммоль), 2-бром-5-метилпиридин (3,75 г, 21,4 ммоль), карбонат калия (7 г, 51 ммоль), 1,4-диоксан (130 мл) и ДМФА (0,5 мл). Реакционную смесь нагревают при 110°C в течение 4 ч. Смесь охлаждают до температуры окружающей среды, фильтруют через диатомовую землю и промывают 1,4-диоксаном. Фильтрат концентрируют в вакууме с получением темно-коричневого масла. Полученный остаток очищают флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя смесью 0-60% EtOAc/гексан в течение 25 мин, с получением указанного в заголовке соединения в виде светлого твердого вещества (5 г, 62%). ЭР/МС m/z 336 (M+H).

Пример получения 5.

Бензил-N-[2-оксо-1-(2-пиридил)-3-пиридил]карбамат

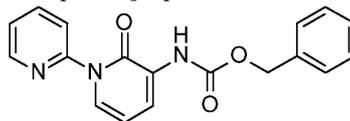


Схема 2, стадия А: в сосуд высокого давления загружают бензил-N-(2-оксо-1H-пиридин-3-ил)карбамат (10,10 г, 41,36 ммоль), иодид меди (1,6 г, 8,6 ммоль), 2-бромпиридин (5,2 мл, 54 ммоль), карбонат калия (11,8 г, 86 ммоль), 1,4-диоксан (200 мл) и N',N'-диметилэтан-1,2-диамин (2 мл, 17,4 ммоль). Реакционную смесь нагревают при 115°C в течение 18 ч. Смесь охлаждают до температуры окружающей среды и фильтруют через диатомовую землю. Фильтрат концентрируют в вакууме с получением коричневого масла. Полученный остаток очищают флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя смесью 0-60% EtOAc/гексан в течение 30 мин, с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (10,14 г, 76%). ЭР/МС m/z 322,0 (M+H).

Пример получения 6.

Бензил-N-[1-(6-метил-2-пиридил)-2-оксо-3-пиридил]карбамат

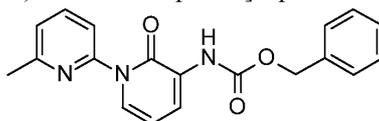


Схема 2, стадия А: в сосуд высокого давления загружают бензил-N-(2-оксо-1H-пиридин-3-ил)карбамат (9,8 г, 40 ммоль), иодид меди (1,9 г, 10 ммоль), 2-бром-6-метилпиридин (5,9 мл, 51 ммоль), карбонат калия (11 г, 80 ммоль), N',N'-диметилэтан-1,2-диамин (2 мл) и 1,4-диоксан (190 мл). Реакционную смесь нагревают при 115°C в течение 5 ч. Смесь охлаждают до температуры окружающей среды и фильтруют через диатомовую землю. Фильтрат концентрируют в вакууме с получением коричневого масла. Полученный остаток очищают флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя смесью 0-50% EtOAc/гексан в течение 30 мин, с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (7,77 г, 58%). ЭР/МС m/z 336,0 (M+H).

Пример получения 7.

3-Амино-1-(5-метил-2-пиридил)пиридин-2-он

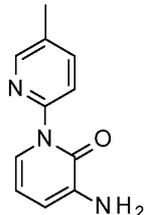


Схема 2, стадия В: смесительную колбу Парра продувают азотом и загружают 10% Pd/C (1,27 г, 1,19 ммоль). Смесительную колбу Парра продувают азотом, а затем загружают MeOH (25 мл) и бензил-N-[1-(5-метил-2-пиридил)-2-оксо-3-пиридил]карбамат (5,0 г, 15 ммоль), растворенный в MeOH (25 мл) и EtOAc (10 мл). Смесительную колбу Парра запечатывают, продувают азотом, затем водородом, и повышают давление до 138 кПа. Смесь перемешивают при 30°C в течение 20 мин. Реакционную смесь фильтруют, и растворитель концентрируют в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества желтого цвета (2,7 г, 90%). ЭР/МС m/z 202 (M+H).

Пример получения 8.

3-Амино-1-(2-пиридил)пиперидин-2-он

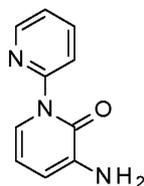


Схема 2, стадия В: смесительную колбу Парра продувают азотом и загружают 20% Pd(OH)₂/C (5,7 г, 41 ммоль). Смесительную колбу Парра продувают азотом, а затем загружают EtOH (200 мл) и бензил-N-[2-оксо-1-(2-пиридил)-3-пиридил]карбамат (9,2 г, 29 ммоль), растворенный в EtOH (200 мл). Смесительную колбу Парра запечатывают, продувают азотом, затем водородом, и повышают давление до 48 кПа. Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 50 мин. Реакционную смесь фильтруют, и растворитель концентрируют в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде желтого твердого вещества (5,3 г, 99%). ЭР/МС m/z 188,0 (M+H).

Пример получения 9.

3-Амино-1-(6-метил-2-пиридил)пиридин-2-он

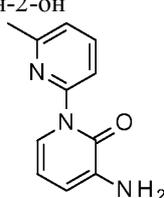


Схема 2, стадия В: в смесительную колбу Парра, продуваемую азотом, загружают 20% Pd(OH)₂/C (7,7 г, 55 ммоль). Смесительную колбу Парра продувают азотом, а затем загружают EtOH (200 мл) и бензил-N-[1-(6-метил-2-пиридил)-2-оксо-3-пиридил]карбамат (7,77 г, 23 ммоль), растворенный в EtOH (200 мл). Смесительную колбу Парра запечатывают, продувают азотом, затем водородом, и повышают давление до 62 кПа. Смесь перемешивают при температуре окружающей среды в течение 55 мин. Реакционную смесь фильтруют, и растворитель концентрируют в вакууме до вязкого масла. Неочищенный материал суспендируют в ДХМ (40 мл), и при перемешивании добавляют гексан до образования осадка. Смесь фильтруют, и сушат на воздухе с получением указанного в заголовке соединения в виде рыжеватого-коричневого твердого вещества (3,0 г, 51%). ЭР/МС m/z 202,0 (M+H).

Пример получения 10.

Этил-7-гидрокси-5-оксо-4Н-пиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоксилат

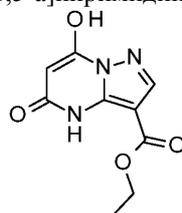


Схема 3, стадия А: этил-5-амино-1Н-пиразол-4-карбоксилат (12,5 г, 80,6 ммоль) и ДЭМ (18,5 мл, 121 ммоль) растворяют в EtOH (90 мл). К этой смеси добавляют NaOEt (21 мас.% в EtOH, 45,1 мл, 121 ммоль), и реакционную смесь перемешивают при 90°C в течение 24 ч. По истечении этого времени реакционную смесь охлаждают до температуры окружающей среды. Затем смесь подкисляют 5 н. водным раствором HCl, и полученный осадок фильтруют, получая указанное в заголовке соединение в виде белого твердого вещества (11,7 г, 65,1%). ЭР/МС m/z 224 (M+H).

Альтернативный пример получения 10.

Схема 3, стадия А: к раствору этил-5-амино-1Н-пиразол-4-карбоксилата (400 г, 2,58 моль) и ДЭМ (584 мл, 3,87 моль) в EtOH (6,00 л) добавляют трет-бутоксид калия (578 г, 5,16 моль) при 25°C в атмосфере азота. Раствор перемешивают при 80°C в течение 12 ч, и затем реакционную смесь охлаждают до 22°C. Реакционную смесь разбавляют 0,1 н. HCl (2 л), и pH доводят до 3 с помощью 5 н. HCl. Реакционную смесь фильтруют, и осадок на фильтре промывают водой (800 мл). Твердое вещество сушат в вакууме до постоянной массы, получая указанное в заголовке соединение в виде грязно-белого твердого вещества (460 г, 81%). ЭР/МС m/z 224 (M+H).

Пример получения 11.

Этил-5,7-дихлорпиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоксилат

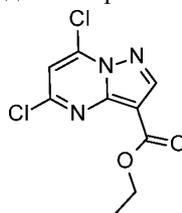


Схема 3, стадия В: этил-7-гидрокси-5-оксо-4Н-пиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоксилат (11,7 г, 52,4 ммоль) суспендируют в ацетонитриле (50 мл) и продувают азотом в течение 5 мин. К этой смеси добавляют POCl₃ (14,8 мл, 157 ммоль), затем пиридин (4,28 мл, 52,4 ммоль) при 50°C, и затем реакционную смесь перемешивают при 100°C в течение 5 ч. По истечении этого времени реакционную смесь охлаждают до температуры окружающей среды и выливают в смесь лед/вода. Указанную смесь нейтрализуют насыщенным водным раствором бикарбоната натрия, и полученный осадок фильтруют, получая указанное в заголовке соединение в виде белого твердого вещества (13 г, 95,3%). ЭР/МС m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 260/262 [M+H]⁺.

Альтернативный пример получения 11.

Схема 3, стадия В: к суспензии этил-7-гидрокси-5-оксо-4Н-пиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоксилата (400 г, 1,79 моль) в ацетонитриле (2 л) по каплям добавляют POCl₃ (416 мл, 4,48 моль) и пиридин (217 мл, 2,69 моль) при 50°C в атмосфере азота. Перемешивают реакционную смесь при 80°C в

течение 12 ч. Реакционную смесь концентрируют в вакууме, и остаток выливают в воду (2 л). Реакционную смесь фильтруют, и твердое вещество промывают водой (800 мл). Твердое вещество сушат в вакууме до постоянной массы, получая указанное в заголовке соединение в виде оранжевого твердого вещества (360 г, 66%). ЭР/МС m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 260/262 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Пример получения 12.

Этил-5-хлор-7-(метиламино)пиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоксилат



Схема 3, стадия С: этил-5,7-дихлорпиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоксилат (50,0 г, 192 ммоль) добавляют к ТГФ (250 мл), и раствор охлаждают до 10°C. Затем добавляют раствор MeNH_2 (33 мас.% в EtOH) (79 мл, 634 ммоль), поддерживая температуру ниже 20°C. Реакционную смесь перемешивают, нагревают до 22°C и перемешивают в течение 4 ч. Затем добавляют воду (300 мл), и смесь перемешивают еще в течение 1 ч.

Полученные твердые вещества собирают путем фильтрации, и промывают смесью ТГФ/вода (2:3) (100 мл) и водой (400 мл). Затем твердое вещество сушат в вакууме (10 мбар/50°C) до постоянной массы, получая указанное в заголовке соединения в виде бледно-коричневого твердого вещества (49,5 г, 90%). ЭР/МС m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 255/257 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Пример получения 13.

5-Хлор-7-(метиламино)пиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоновая кислота

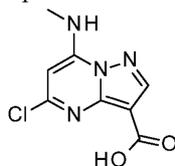


Схема 4, стадия А: 1 н. NaOH (50 мл, 50 ммоль) добавляют к этил-5-хлор-7-(метиламино)пиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоксилату (9,05 г, 35,5 ммоль) в 1,4-диоксане (50 мл), и смесь нагревают до 50°C. Через 16 ч указанную смесь охлаждают до температуры окружающей среды, и рН доводят до ~3 добавлением 1 н. HCl . Полученное твердое вещество собирают и сушат в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде светло-коричневого твердого вещества (8,0 г, >99%). ЭР/МС m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 227/229 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Пример получения 14.

5-Хлор-7-(метиламино)-N-[(3R)-1-метил-2-оксопирролидин-3-ил]пиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоксамида

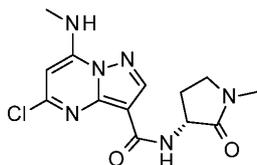


Схема 4, стадия Б: к смеси 5-хлор-7-(метиламино)пиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоновой кислоты (4,3 г, 19 ммоль) и (R)-3-амино-1-метилпирролиндин-2-она (2,4 г, 21 ммоль) в ДМФА (95 мл) добавляют DIEA (14 мл, 80 ммоль) и ВОР (11 г, 24 ммоль). Смесь перемешивают при температуре окружающей среды в течение 2 ч и затем гасят водой, что приводит к образованию грязно-белого твердого вещества. Полученное твердое вещество фильтруют и сушат в вакууме при температуре окружающей среды с получением указанного в заголовке соединения в виде грязно-белого твердого вещества (5 г, 82%). ЭР/МС m/z 323 (M+H).

Пример получения 15.

Этил-7-(метиламино)-5-[[1-(6-метил-2-пиридил)-2-оксо-3-пиридил]амино]пиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоксилат

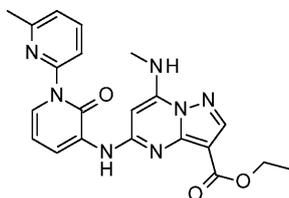


Схема 3, стадия D: в круглодонную колбу загружают этил-5-хлор-7-(метиламино)пиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоксилат (2 г, 7,8 ммоль), ацетат калия (2,2 г, 15,7 ммоль) и 2-метилбутан-2-ол (25 мл). Колбу продувают азотом в течение 5 мин. Добавляют Pd-175 [tBuBrettPhos Pd(аллил)]OTf (184 мг, 0,24 ммоль) и уксусную кислоту (0,045 мл, 0,79 ммоль). Смесь нагревают при 100°C в течение 18 ч. Затем смесь охлаждают до температуры окружающей среды и разбавляют смесью ДХМ/вода (30 мл). Смесь фильтруют и сушат в вакууме при температуре окружающей среды с получением указанного в заголовке соединения (2,4 г, 73%). ЭР/МС m/z 420,0 (M+H).

Пример получения 16.

7-(Метиламино)-5-[[1-(6-метил-2-пиридил)-2-оксо-3-пиридил]амино]пиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоновая кислота

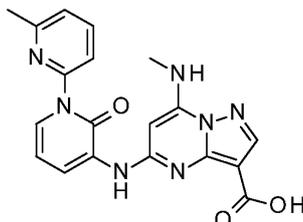


Схема 3, стадия E: в круглодонную колбу загружают этил-7-(метиламино)-5-[[1-(6-метил-2-пиридил)-2-оксо-3-пиридил]амино]пиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоксилат (2,4 г, 5,7 ммоль), EtOH (20 мл) и гидроксид лития (0,34 г, 4,1 ммоль), растворенные в воде (12 мл). Смесь кипятят с обратным холодильником в атмосфере азота в течение 18 ч, а затем оставляют для охлаждения до температуры окружающей среды. pH доводят до ~2 добавлением 1 н. HCl. После перемешивания в течение 30 мин полученное твердое вещество фильтруют, промывают ледяной водой (20 мл) и сушат в вакууме при температуре окружающей среды с получением указанного в заголовке соединения (1,6 г, 71%). ЭР/МС m/z 392,0 (M+H).

Пример получения 17.

Получение меченого вещества для анализа связывания меченого вещества ТУК2-ЈН2.

(2E)-2-[(2E,4E)-5-[3-[6-[4-[4-[[5-[2-Метокси-3-(1-метил-1,2,4-триазол)-3-ил]анилино]-6-(метилкарбамоил)-1,2,4-триазин-3-ил]амино]пиразол-1-ил]-1-пиперидил]-6-оксогексил]-3-метил-5-сульфонато-1-(3-сульфонатопропил)индол-1-ий-2-ил]пента-2,4-диенилиден]-3,3-диметил-1-(3-сульфонатопропил)индолин-5-сульфонат; триэтиламмоний.

2-Метокси-3-(1-метил-1,2,4-триазол-3-ил)анилин (5,95 г, 29,1 ммоль) добавляют к этил-5-хлор-3-метилсульфанил-1,2,4-триазин-6-карбоксилату (6,8 г, 29,0 ммоль) в NMP (20 мл) и перемешивают при температуре окружающей среды. Через 90 мин добавляют диэтиловый эфир (100 мл), и смесь перемешивают в течение 15 мин. Полученное твердое вещество фильтруют и промывают диэтиловым эфиром. Твердое вещество распределяют между ДХМ и насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Органический слой дополнительно промывают насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушат над сульфатом натрия, фильтруют и выпаривают, получая этил-5-[2-метокси-3-(1-метил-1,2,4-триазол-3-ил)анилино]-3-метилсульфанил-1,2,4-триазин-6-карбоксилат в виде бледно-желтого твердого вещества (10,12 г, 82%). ЭР/МС m/z 402,2 (M+H).

Этил-5-[2-метокси-3-(1-метил-1,2,4-триазол-3-ил)анилино]-3-метилсульфанил-1,2,4-триазин-6-карбоксилат (10,12 г, 23,7 ммоль) перемешивают в 2M MeNH₂ в ТГФ (75 мл, 150 ммоль) при температуре окружающей среды в течение 4 ч. Добавляют диэтиловый эфир (100 мл), и смесь перемешивают в течение 15 мин.

Полученное твердое вещество собирают, промывают диэтиловым эфиром (50 мл) и сушат в вакууме, получая 5-[2-метокси-3-(1-метил-1,2,4-триазол-3-ил)анилино]-N-метил-3-метилсульфанил-1,2,4-триазин-6-карбоксамид в виде светло-желтого твердого вещества (8,03 г, 78%). ЭР/МС m/z 387,0 (M+H).

m-Хлорпероксибензойную кислоту (703 мг, 3,14 ммоль) добавляют к суспензии 5-[2-метокси-3-(1-метил-1,2,4-триазол-3-ил)анилино]-N-метил-3-метилсульфанил-1,2,4-триазин-6-карбоксамид (500 мг, 1,26 ммоль) в ДМФА (12,5 мл) при 0°C и нагревают до температуры окружающей среды. Через 30 мин добавляют трет-бутил-4-(4-аминопиразол-1-ил)пиперидин-1-карбоксилат (520 мг, 1,89 ммоль), и смесь перемешивают при температуре окружающей среды. Через 24 ч смесь распределяют между ДХМ и насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Органический слой сушат над сульфатом магния, фильтруют и упаривают.

Полученное твердое вещество несколько раз растирают с диэтиловым эфиром и сушат в вакууме, получая трет-бутил-4-[4-[[5-[2-метокси-3-(1-метил-1,2,4-триазол-3-ил)анилино]-6-(метилкарбамоил)-1,2,4-триазин-3-ил]амино]пиразол-1-ил]пиперидин-1-карбоксилат в виде желтого твердого вещества с чистотой 86% (720 мг, 81%). ЭР/МС m/z 605,2 (M+H).

4 н. HCl в диоксане (2,5 мл, 10 ммоль) добавляют к суспензии трет-бутил-4-[4-[[5-[2-метокси-3-(1-метил-1,2,4-триазол-3-ил)анилино]-6-(метилкарбамоил)-1,2,4-триазин-3-ил]амино]пиразол-1-ил]пиперидин-1-карбоксилата (720 мг, 1,0 ммоль) в MeOH (5 мл) и перемешивают при температуре ок-

ружающей среды. Через 72 ч смесь упаривают. Полученный материал распределяют между ДХМ (100 мл) и водой (20 мл). pH водного слоя доводят до >8 добавлением 1 н. NaOH и экстрагируют смесью 3:1 хлороформ/изопропанол. Органические слои объединяют, сушат над сульфатом магния, фильтруют и упаривают. Полученное твердое вещество растирают с диэтиловым эфиром и затем сушат в вакууме, получая 5-[2-метокси-3-(1-метил-1,2,4-триазол-3-ил)анилино]-N-метил-3-[[1-(4-пиперидил)пиразол-4-ил]амино]-1,2,4-триазин-6-карбоксамид в виде желтого твердого вещества с чистотой 86% (585 мг, 97%). ЭР/МС m/z 505,0 (M+H).

Раствор (2E)-2-[(2E,4E)-5-[3-[6-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси-6-оксогексил]-3-метил-5-сульфонато-1-(3-сульфонатопропил)индол-1-ий-2-ил]пента-2,4-диенилиден]-3,3-диметил-1-(3-сульфонатопропил)индолин-5-сульфоната триэтиламмония (10 мг, 0,008 ммоль) в ДМСО (1 мл) добавляют к раствору 5-[2-метокси-3-(1-метил-1,2,4-триазол-3-ил)анилино]-N-метил-3-[[1-(4-пиперидил)пиразол-4-ил]амино]-1,2,4-триазин-6-карбоксамид (4,5 мг, 0,008 ммоль) и ТЭА (0,002 мл, 0,014 ммоль) в ДМСО (1 мл). Реакционный сосуд заворачивают в алюминиевую фольгу для защиты от света и перемешивают при температуре окружающей среды в течение ночи. Полученный остаток очищают препаративной ВЭЖХ (Kinetic EVO C18 30 мм×100 мм, 5 мкм), элюируя 0-20% ацетонитрила в воде, с получением указанного в заголовке соединения в виде ярко-синего твердого вещества (8,5 мг, 65%). ЭР/МС m/z 673,4 (M+H).

Пример 1.

7-(Метиламино)-N-[(3R)-1-метил-2-оксопирролидин-3-ил]-5-[[1-(5-метил-2-пиридил)-2-оксо-3-пиридил]амино]пиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоксамид

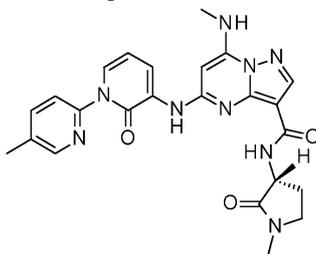


Схема 4, стадия С: в сосуд для микроволнового реактора загружают 5-хлор-7-(метиламино)-N-[(3R)-1-метил-2-оксопирролидин-3-ил]пиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоксамид (76 мг, 0,23 ммоль), 3-амино-1-(5-метил-2-пиридил)пиридин-2-он (72 мг, 0,359 ммоль), ацетат калия (48 мг, 0,47 ммоль), 2-метилбутан-2-ол (0,8 мл) и 1,4-диоксан (0,8 мл). Колбу продувают азотом в течение 5 мин. Добавляют BINAP (59 мг, 0,093 ммоль) и димер хлорида аллилпалладия(II) (16,7 мг, 0,0447 ммоль). Сосуд нагревают в микроволновом реакторе при 120°C. Спустя 20 мин смесь охлаждают до температуры окружающей среды и фильтруют через диатомовую землю. Полученный остаток очищают хроматографией с обращенной фазой с получением указанного в заголовке соединения (87 мг, 75%). ЭР/МС m/z 488,2 (M+H).

Пример 2.

7-(Метиламино)-N-[(3R)-1-метил-2-оксопирролидин-3-ил]-5-[[1-(6-метил-2-пиридил)-2-оксо-3-пиридил]амино]пиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоксамид

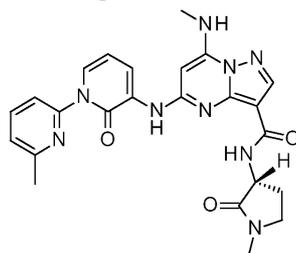


Схема 3, стадия F: к смеси 7-(метиламино)-5-[[1-(6-метил-2-пиридил)-2-оксо-3-пиридил]амино]пиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоновой кислоты (1,2 г, 3,1 ммоль) и (3R)-3-амино-1-метилпирролидин-2-он; 4-метилбензолсульфоновой кислоты (0,9 г, 3 ммоль) в ДМФА (15 мл) добавляют DIEA (2,1 мл, 12 ммоль) и BOP (1,8 г, 3,9 ммоль). После перемешивания при температуре окружающей среды в течение 1 часа реакционную смесь добавляют к воде (240 мл) и доводят pH до ~6-7. После перемешивания в течение 30 мин полученное твердое вещество фильтруют, промывают ледяной водой (20 мл) и сушат в вакууме при температуре окружающей среды. Полученный остаток очищают хроматографией с обращенной фазой и перекристаллизовывают из MeOH с получением указанного в заголовке соединения (446 мг, 30%). ЭР/МС m/z 488,2 (M+H).

Пример 3.

7-(Метиламино)-N-[(3R)-1-метил-2-оксопирролидин-3-ил]-5-[[2-оксо-1-(2-пиридил)-3-пиридил]амино]пиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоксамид

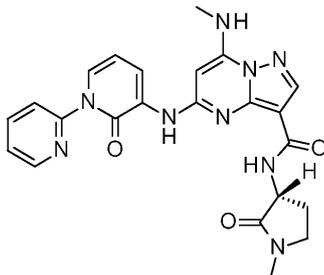


Схема 4, стадия С: в сосуд для микроволнового реактора загружают 5-хлор-7-(метиламино)-N-[(3R)-1-метил-2-оксопирролидин-3-ил]пиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоксамид (0,302 г, 0,935 ммоль), 3-амино-1-(2-пиридил)пиримидин-2-он (0,21 г, 1,1 ммоль), ацетат калия (281 мг, 2,7 ммоль), 2-метилбутан-2-ол (7,5 мл) и 1,4-диоксан (7,5 мл). Колбу продувают азотом в течение 5 мин. Добавляют Pd-175 [tBu-BrettPhos Pd(аллил)]OTf (30 мг, 0,038 ммоль). Сосуд нагревают в микроволновом реакторе при 140°C. Спустя 40 мин смесь охлаждают до температуры окружающей среды и фильтруют через диатомовую землю. Полученный остаток очищают хроматографией с обработанной фазой с получением указанного в заголовке соединения (265 мг, 60%). ЭР/МС (m/z): 474,2 (M+H).

Анализ связывания меченого вещества ТУК2-ЈН2.

Домен псевдокиназы (ЈН2) ЈАК человека (семейство цитоплазматических тирозинкиназ Януса) семейства тирозинкиназ 2 (ТУК2) (Genbank NP_003322) с N-концевой меткой His6 экспрессируют в бакуловирусе и очищают с помощью аффинной хроматографии HisPur Ni-NTA и эксклюзионной хроматографии Superdex 200. Соединение, полученное в примере получения 17, представляющее собой конъюгат красителя Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific) и подходящего связующего ТУК2 ЈН2, упоминается в настоящем документе как "меченое вещество". Готовят 3-кратное 10-точечное серийное разведение соединения (Примеры 1, 2 и 3) в 100% ДМСО и переносят в концентрации 50 нл/лунку на белый планшет Proxiplate-384F (PerkinElmer 6008280) с использованием акустической обработки жидкости. Контрольные лунки, используемые для определения процента ингибирования, содержали 100% ДМСО (50 нл) и либо буфер для анализа, содержащий меченое вещество (конечная концентрация 2,00 нМ) (мин., низкий FRET), либо разбавленный фермент ТУК2-ЈН2 (конечная концентрация 0,200 нМ) и меченое вещество (конечная концентрация 2,00 нМ) (макс., высокий FRET).

5,0 мкл His-меченого ТУК2-ЈН2 (0,402 нМ) и антитела LanthaScreen Eu-анти-HIS (4,02 нМ, LifeTech, PV5597) в буфере для анализа (50 мМ HEPES pH 7,5, 10 мМ хлорида магния, 1 мМ этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N''-тетрауксусная кислота, 0,01% Brij-35 и Milli-Q) воду добавляют в планшет Proxiplate-384, содержащий 50 нл разведенного соединения, и контрольные лунки. 5,0 мкл меченого вещества (конечная концентрация 2,00 нМ) в буфере для анализа добавляют в планшет и оставляют для уравнивания в течение 30 мин при температуре окружающей среды. Через 30 мин планшет подсчитывают на приборе PerkinElmer Envision со следующими настройками: возбуждение (340 нм), эмиссия меченого вещества (665 нм) и эмиссия антител LanthaScreen Eu-анти-His (615 нм). Определяют отношение эмиссии меченого вещества (665 нм) к эмиссии антител LanthaScreen Eu-анти-His (615 нм). Отношение процентного ингибирования при каждой концентрации ингибитора рассчитывают с использованием контрольных лунок макс. и мин. и подгоняют к четырехпараметрическому нелинейному логистическому уравнению в GeneData Screener®, чтобы получить IC₅₀ для тестируемых соединений. Данные, описанные в табл. 1, демонстрируют, что соединения из примеров 1-3 связываются с псевдокиназным доменом ТУК2-ЈН2 in vitro.

Таблица 1
Значения IC₅₀ для примеров 1-3

Соединение	Связывание ТУК2-ЈН2 (нМ)
Пример 1	<0,254 (n=4)
Пример 2	<0,254 (n=1)
Пример 3	<0,254 (n=3)

Ингибирование передачи сигналов IFNα через pSTAT1 в клетках TF1.

Клетки TF1 (ATCC, CL-2003) выращивают в среде RPMI 1640 (GIBCO) с добавлением 10% диализированной ФБС, 0,1 мг/мл ампициллина и 2 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора. Клетки TF1 (100 К на лунку) высевают в 96-луночные покрытые поли-D-лизином планшеты в среде DMEM без сыворотки и инкубируют в течение ночи при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Пример 1 серийно разводят в ДМСО, добавляют к клеткам и инкубируют при 37°C в течение 1 ч. Затем

клетки стимулируют 10 нг/мл IFN α 2 при 37°C в течение 20 мин. После удаления среды клетки лизируют в буфере, содержащем смесь Halt-протеазы и ингибитора фосфатазы (Thermo Scientific #78441), при температуре окружающей среды в течение 30 мин. Количество p-Stat1 (Tyr701) определяют количественно как излучение света при 615 нм с использованием набора для анализа AlphaLISA SureFire Ultra p-Stat1 (Tyr701) (Perkin Elmer #ALSU-PST1-A50K) в соответствии с протоколом, рекомендованным поставщиком. Рассчитывают процентное ингибирование при каждой концентрации ингибитора и подгоняют к нелинейному логистическому уравнению с четырьмя параметрами с использованием Genedata Screener® для получения IC₅₀ для тестируемых соединений, выраженных в виде средних значений GeoMetric со стандартной ошибкой среднего (SEM). Данные, описанные в табл. 2, демонстрируют, что соединения из примеров 1-3 являются ингибиторами передачи сигналов IFN α через pSTAT1 в клетках TF1.

Таблица 2
Значения IC₅₀ для примеров 1-3

Соединение	Инг. IFN α (мкМ)
Пример 1	0,112 (\pm 0,055 мкМ, n=4)
Пример 2	0,206 (\pm 0,065 мкМ, n=3)
Пример 3	0,106 (\pm 0,070 мкМ, n=3)

Анализ IL23 pSTAT3 AlphaLISA.

IL-2-зависимые клетки Kit225 (Онкологический центр Андерсона, Университет штата Техас), экспрессирующие эндогенные рецепторы IL-23, стабильно трансдуцируют с помощью репортера Lenti STAT3, связанного с люциферазой светлячка (SABiosciences CLS-6028L). Указанные клетки используют для мониторинга активности TYK2 путем количественной оценки экспрессии генов, вызванной фосфорилированием STAT3 после индукции IL-23 в присутствии IL-2 с использованием технологии AlphaLISA (TGR Biosciences ALSU-TST3-A50K). Клетки выращивают в среде RPMI 1640 (Gibco 22400) с добавлением 10% ФБС (Invitrogen 10082), 1X Pen/Strep (Gibco 15140-122), 200 нг/мл пуромицина (Sigma P9620) и 10 нг/мл свежего рекомбинантного человеческого IL-2 (Системы R&D 202-IL-50).

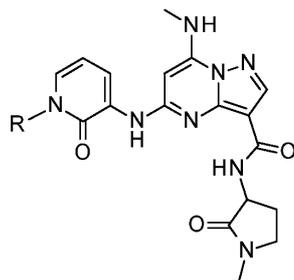
Для подготовки к анализу клетки помещают в 384-луночные планшеты Biocoat, покрытые черным поли-d-лизинном, с прозрачным дном (Becton Dickinson Bio-Coat 35-4640) в среде DMEM (Sigma D5796) в количестве 300000 клеток/луночку, и оставляют для инкубирования в течение ночи при 37°C. Соединения, солюбилизированные в ДМСО, серийно разбавляют 1:3, чтобы получить 10-точечную кривую концентрация-эффект (конечный ДМСО =0,1%). Клетки предварительно инкубируют с примером 1 в течение 1 ч при 37°C, затем стимулируют IL-23 (конечная концентрация 25 нг/мл) в течение 30 мин. После центрифугирования при 2000 об/мин в течение 10 мин клеточный осадок лизируют смесью лизирующего буфера 1:1 (TGR Biosciences) и смеси ингибиторов протеазы и фосфатазы Halt (Thermo Scientific 1861281) в течение 30 мин. Реакцию AlphaLISA проводят в соответствии с протоколом, рекомендованным поставщиком, и уровни люциферазы измеряют с помощью планшетного ридера Envision (Perkin Elmer). Относительный IC₅₀ рассчитывают с использованием 4-параметрического нелинейного логистического уравнения (GeneData Screener 13.0.5), чтобы получить IC₅₀ для протестированных соединений, выраженный в виде средних значений GeoMetric со стандартной ошибкой среднего (SEM). Данные, описанные в табл. 3, демонстрируют, что соединения из примеров 1-3 являются ингибиторами передачи сигналов IL-23 в анализе на основе клеток.

Таблица 3
Значения IC₅₀ для примеров 1-3

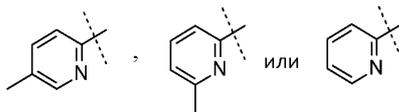
Соединение	Инг. IL-23 (мкМ)
Пример 1	0,065 (\pm 0,011 мкМ, n=4)
Пример 2	0,101 (\pm 0,0005 мкМ, n=2)
Пример 3	0,101 (\pm 0,022 мкМ, n=3)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы

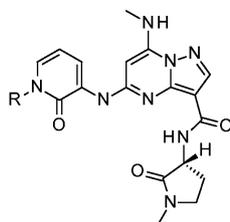


где R представляет собой



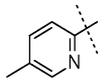
или его фармацевтически приемлемую соль.

2. Соединение по п.1 формулы



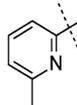
или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Соединение по п.1, где R представляет собой



или его фармацевтически приемлемая соль.

4. Соединение по п.1, где R представляет собой



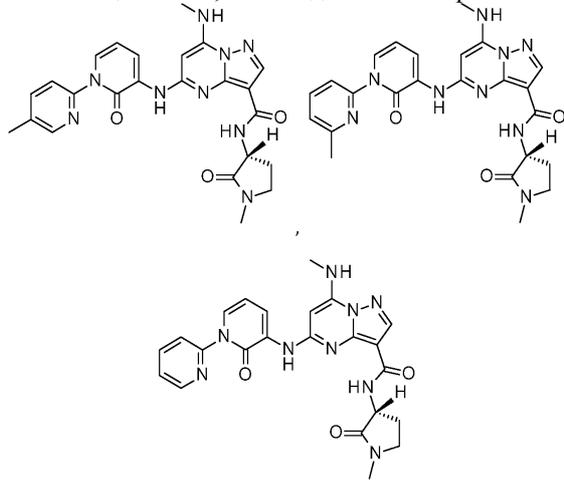
или его фармацевтически приемлемая соль.

5. Соединение по п.1, где R представляет собой



или его фармацевтически приемлемая соль.

6. Соединение по п.1, отличающееся тем, что соединение выбрано из



или его фармацевтически приемлемая соль.

7. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-6 для лечения псориаза.

8. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-6 для лечения системной красной волчанки.

9. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-6 для лечения диабета 1 типа.

10. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-6 для получения лекарственного средства для лечения псориаза.

11. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-6 для получения лекарственного средства для лечения системной красной волчанки.

12. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-6 для получения лекарственного средства для лечения диабета 1 типа.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение или его фармацевтически приемлемую соль по любому из пп.1-6 с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами.

