

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 047433

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

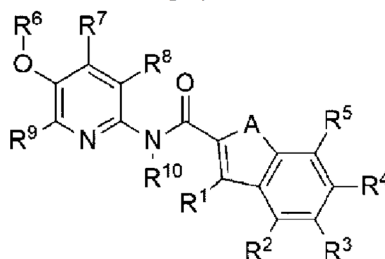
(45) Дата публикации и выдачи патента	2024.07.19	(51) Int. Cl.	C07D 401/12 (2006.01) A61K 31/4439 (2006.01) A61K 31/4436 (2006.01) A61K 31/444 (2006.01) A61K 31/443 (2006.01) A61P 1/00 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01) C07D 405/12 (2006.01) C07D 409/12 (2006.01) C07D 409/14 (2006.01)
(21) Номер заявки	202290965		
(22) Дата подачи заявки	2020.09.24		

(54) ПРОИЗВОДНОЕ ГЕТЕРОАРИЛАМИДОПИРИДИНОЛА И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ЕГО В КАЧЕСТВЕ АКТИВНОГО ИНГРЕДИЕНТА, ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ИЛИ ЛЕЧЕНИЯ АУТОИММУННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

(31) 10-2019-0117253	(72) Изобретатель:
(32) 2019.09.24	Дзеонг Биеонг-Сеон, Ким Дзунг-Ае, Нам Тае-гиу (KR)
(33) KR	(74) Представитель:
(43) 2022.07.01	Медведев В.Н. (RU)
(86) PCT/KR2020/013003	(56) WO-A1-2019087129 WO-A2-2004076412 KR-A-1020140125738 JP-A-2012107001 WO-A2-2007022380
(87) WO 2021/060890 2021.04.01	
(71)(73) Заявитель и патентовладелец: ИННОВО ТЕРАПЬЮТИКС ИНК. (KR)	

(57) Настоящее изобретение относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли, где соединение выбирают из 5-бром-N-(5-гидрокси-3,4,6-триметилпиридин-2-ил)-1H-индол-2-карбоксиамида; N-(5-гидрокси-3,4,6-триметилпиридин-2-ил)-5-метил-1H-индол-2-карбоксиамида; 3-хлор-6-фтор-N-(5-гидрокси-3,4,6-триметилпиридин-2-ил)бензо[b]тиофен-2-карбоксиамида; и 3-хлор-6-фтор-N-(3,4,6-триметил-5-(2-оксо-2-(фениламино)этокси)пиридин-2-ил)бензо[b]тиофен-2-карбоксиамида; где соединение представлено формулой 1, где A, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹ и R¹⁰ имеют значения, как определено в настоящем описании, и способу профилактики или лечения аутоиммунного заболевания, в частности воспалительного заболевания кишечника, ревматоидного артрита и т.п. Соединение показывает превосходный эффект ингибирования TNF-α- или IL-6-индуцированной адгезии моноцитов к эпителиальным клеткам кишечника и, как доказано, оказывает терапевтический эффект на воспалительное заболевание кишечника и ревматоидный артрит in vivo.

Формула 1



B1

047433

047433 B1

Уровень техники изобретения

1. Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к производному гетероариламидопиридинола и фармацевтической композиции, его содержащей в качестве активного ингредиента, для профилактики или лечения аутоиммунных заболеваний, таких как воспалительное заболевание кишечника и ревматоидный артрит.

2. Описание предшествующего уровня техники

Иммунитет представляет собой одну из систем самозащиты живого организма от всех чужеродных полимеров, которые вторгаются или вводятся в живые ткани. Все нормальные индивидуумы не реагируют пагубно на свои антигены, тогда как они обладают способностью распознавать и реагировать на чужеродные антигены и удалять их. Однако, если иммунная система хозяина не может отличить чужеродные антигены от собственных антигенов и вызывает аномальный иммунный ответ, иммунные клетки в организме атакуют свои собственные клеточные компоненты и вызывают различные заболевания, которые называются аутоиммунными заболеваниями.

Аутоиммунные заболевания вызываются различными причинами, такими как наследственность, стресс, гормоны, тяжелые металлы, продукты питания, инфекции и пестициды, и встречаются примерно у 5-8% населения мира. Примеры аутоиммунных заболеваний включают воспалительное заболевание кишечника, аутизм, астму, диабет 1 типа, ревматоидный артрит, ревматическую полимиалгию, анкилозирующий спондилит, псориаз, экзему, склеродермию, витилиго, рассеянный склероз, IL-17-индуцированную деменцию, периферический неврит, увеит, синдром сухого глаза, отторжение трансплантата органов и рак. В настоящее время противовоспалительные и иммуносупрессивные лекарственные средства используются в качестве терапевтических средств при аутоиммунных заболеваниях, но некоторые пациенты являются устойчивыми к этим препаратам, что затрудняет лечение.

Среди аутоиммунных заболеваний воспалительное воспаление кишечника представляет собой воспалительное заболевание пищеварительного тракта с хроническим и рецидивирующим течением и классифицируется на два заболевания: язвенный колит и болезнь Крона. Точная причина заболевания пока не известна, но оно вызвано неадекватным иммунным ответом на бактерии в кишечном тракте у человека с генетической предрасположенностью. Постоянная или неадекватная активация иммунной системы кишечника, такой как нейтрофилы и макрофаги, которые являются врожденными иммунными клетками, а также лимфоциты, которые являются приобретенными иммунными клетками, в конечном итоге приводит к разрушению слизистой оболочки и изъязвлению. Различные воспалительные цитокины продуцируются и секретируются в слизистой оболочке кишечного тракта в воспаленном состоянии, и среди них TNF- α (фактор некроза опухоли- α) высоко экспрессируется в просвете кишечника и эпителиальных клетках больных язвенным колитом. Согласно последним исследованиям, известно, что TNF- α играет важную роль в патогенезе язвенного колита.

Известно, что инфликсимаб, анти-TNF- α антитело, эффективен не только при лечении фурункулов, но и при лечении болезни Крона, ранее не леченных. Однако такое лечение является дорогостоящим и вызывает у некоторых пациентов побочные эффекты, такие как жидкостные реакции или инфекционные осложнения. Было подтверждено, что тофацитиниб (Xeljanz®), ингибитор Янус-киназы (JAK), обладает терапевтической эффективностью при язвенном колите, но подтверждена его неэффективность при болезни Крона. Другими словами, до сих пор не существует надежных пероральных средств для лечения воспалительного воспаления кишечника, поэтому существует необходимость в разработке эффективного и недорогого перорального средства для лечения этого заболевания.

Среди аутоиммунных заболеваний ревматоидный артрит является достаточно распространенным заболеванием, на долю которого приходится около 1% взрослого населения, и представляет собой заболевание, которое приводит к разрушению и деформации суставов у большинства пациентов, что в конечном итоге приводит к инвалидности. В патофизиологии ревматоидного артрита сообщается, что заболевание возникает в результате активации аутореактивных Т-клеток, специфичных к неопептидам, вырабатываемых антигенами в суставе, такими как коллаген или протеогликан, из-за хронического воспаления после воспалительной реакции в соответствии с вирусной или бактериальной инфекцией. Хорошо известна корреляция между ревматоидным артритом и Т-лимфоцитами, а также В-лимфоцитами и синовиальными клетками. Важными цитокинами, связанными с ревматоидным артритом, являются TNF- α , IL-1 и IL-6. Они увеличивают экспрессию молекул адгезии в эндотелиальных клетках, увеличивая приток лейкоцитов в сустав, и способствуют секреции матриксной металлопротеиназы в синовиальных клетках и хондроцитах, вызывая разрушение тканей. Среди недавно разработанных препаратов для лечения ревматоидного артрита наиболее репрезентативными являются препараты анти-TNF- α антитела, и среди них наиболее часто используемыми препаратами являются этанерцепт (Энбрел®), инфликсимаб (Ремикейд®) и адалимумаб (Хумира®).

Однако эти лекарственные средства дороги, а неудобство приема является препятствием в лечении. Что касается тофацитиниба, который был недавно разработан для лечения ревматоидного артрита и может вводиться перорально, дивертикулит был зарегистрирован как "серьезная" инфекция в серии клинических испытаний, направленных на пациентов с ревматоидным артритом. В частности, поскольку пер-

форация дивертикула, один из случаев перфорации желудочно-кишечного тракта, была зарегистрирована в клинических испытаниях, разделы 'меры предосторожности' и 'Побочные реакции' были обновлены FDA в в декабре 2015 г. На сегодняшний день не разработано безопасное и эффективное пероральное терапевтическое средство, такое как лекарственное средство, нацеленное на TNF- α или рецептор TNF, которое стало наиболее эффективной терапевтической мишенью при ревматоидном артрите. Таким образом, существует потребность в разработке эффективного, недорогого, безопасного и высокоэффективного перорального терапевтического средства для лечения ревматоидного артрита, нацеленного на вышеуказанное.

T-клетки, играющие центральную роль в иммунной системе, биологической системе защиты от различных патогенов, существуют в виде различных типов дифференцированных клеток. Клетки Th1 участвуют в клеточно-опосредованном иммунитете, клетки Th2 участвуют в гуморальном иммунитете, клетки Th17 участвуют в инфекционных и воспалительных заболеваниях, а клетки Treg отвечают за поддержание гомеостаза путем подавления иммунитета. Однако известно, что аутоиммунное заболевание возникает при аномальном повышении активности клеток Th1 и Th17, а иммунное заболевание возникает при аномальном повышении активности клеток Th2 из-за реакции гиперчувствительности. Поскольку клетки Treg, которые могут регулировать активность этих клеток, обладают свойством контролировать воспалительную реакцию, подавляя функции аномально активированных иммунных клеток, сообщалось о многих экспериментах по лечению иммунных заболеваний посредством повышения активности клеток Treg. В случае аутоиммунного заболевания, которое не контролируется клетками Treg, особое внимание уделяется разработке терапевтических средств для лечения аутоиммунного заболевания, направленных на ингибирование активации клеток Th1 и Th17. В дополнение к лечению иммунных заболеваний путем ингибирования активации T-клеток разрабатываются методы лечения, которые контролируют количество цитокинов, секретируемых иммунными клетками, и методы лечения с использованием антител, нацеленных на цитокины, секретируемые иммунными клетками. Однако среди них способ с использованием антител имеет проблемы, связанные с высокой стоимостью получения и неудобным введением. Таким образом, существует необходимость в разработке нового низкомолекулярного соединения для лечения иммунных заболеваний, которое можно было бы вводить перорально с превосходным терапевтическим и профилактическим действием при различных аутоиммунных заболеваниях.

Сущность изобретения

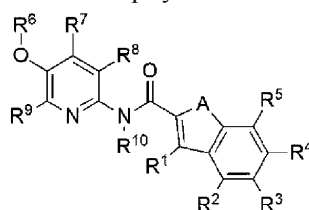
Целью настоящего изобретения является получение производного гетероариламидопиридинола.

Другой целью настоящего изобретения является разработка способа получения производного гетероариламидопиридинола.

Для достижения вышеуказанных целей в одном аспекте настоящего изобретения настоящее изобретение обеспечивает соединение или его фармацевтически приемлемую соль, где соединение выбирают из 5-бром-N-(5-гидрокси-3,4,6-триметилпиридин-2-ил)-1H-индол-2-карбоксамид; N-(5-гидрокси-3,4,6-триметилпиридин-2-ил)-5-метил-1H-индол-2-карбоксамид; 3-хлор-6-фтор-N-(5-гидрокси-3,4,6-триметилпиридин-2-ил)бензо[b]тиофен-2-карбоксамид; и 3-хлор-6-фтор-N-(3,4,6-триметил-5-(2-оксо-2-(фениламино)этокси)пиридин-2-ил)бензо[b]тиофен-2-карбоксамид;

где соединение представлено формулой 1:

Формула 1



где в формуле 1

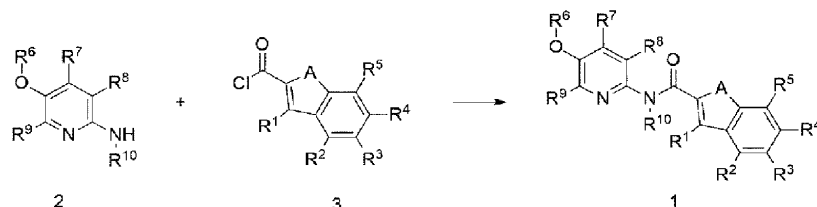
A, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹ и R¹⁰ выбраны из комбинации:

- 1) A представляет собой NH;
R¹, R², R⁴, R⁵, R⁶ и R¹⁰ представляют собой H;
R³ представляет собой Br; и
R⁷, R⁸ и R⁹ представляют собой CH₃;
- 2) A представляет собой NH;
R¹, R², R⁴, R⁵, R⁶ и R¹⁰ представляют собой H;
R³ представляет собой CH₃; и
R⁷, R⁸ и R⁹ представляют собой CH₃;
- 3) A представляет собой S; R¹ представляет собой Cl;
R², R³, R⁵, R⁶ и R¹⁰ представляют собой H;
R⁴ представляет собой F; и

R^7 , R^8 и R^9 представляют собой CH_3 ; и
 4) A представляет собой S ; R^1 представляет собой Cl ;
 R^2 , R^3 , R^5 и R^{10} представляют собой H ;
 R^4 представляет собой F ;
 R^6 представляет собой $-CH_2-C(O)-NH$ -фенил; и
 R^7 , R^8 и R^9 представляют собой CH_3 .

В другом аспекте настоящего изобретения настоящее изобретение обеспечивает способ получения соединения, представленного формулой 1, взаимодействие соединения, представленного формулой 2, с соединением, представленным формулой 3, как показано в схеме реакции 1 ниже:

Схема реакции 1



(в схеме реакции 1

A , R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 и R^{10} имеют значения, как определено в настоящем описании).

В другом аспекте настоящего изобретения настоящее изобретение обеспечивает способ получения 3-хлор-6-фтор-N-(3,4,6-триметил-5-(2-оксо-2-(фениламино)этокси)пиридин-2-ил)бензо[b]тиофен-2-карбоксиамида, представленного формулой 1, где A представляет собой S ; R^1 представляет собой Cl ; R^2 , R^3 и R^5 представляют собой H ; R^4 представляет собой F ; R^6 представляет собой $-CH_2-C(O)-NH$ -фенил; R^7 , R^8 , и R^9 представляют собой CH_3 ; R^{10} представляет собой H ,

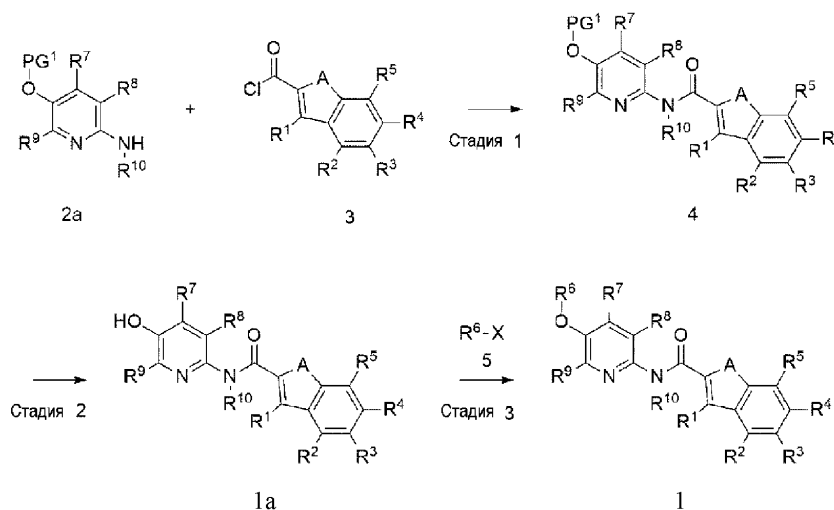
включающий следующие стадии, как показано в схеме реакции 2 ниже:

получение соединения, представленного формулой 4, путем взаимодействия соединения, представленного формулой 2а, с соединением, представленным формулой 3 (стадия 1);

получение соединения, представленного формулой 1а, путем удаления защитной группы у соединения, представленного формулой 4, полученного на стадии 1 выше (стадия 2); и

получение соединения, представленного формулой 1, путем взаимодействия соединения, представленного формулой 1а, полученного на стадии 2 выше, с соединением, представленным формулой 5 (стадия 3):

Схема реакции 2



(в схеме реакции 2, соединение, представленное формулой 1, представляет собой 3-хлор-6-фтор-N-(3,4,6-триметил-5-(2-оксо-2-(фениламино)этокси)пиридин-2-ил)бензо[b]тиофен-2-карбоксиамид, соединение, представленное формулой 1а, представляет собой производное формулы 1, где R^6 представляет собой водород, PG^1 представляет собой защитную группу для спирта, выбранную из группы, состоящей из ацетила (Ac), бензоила (Bz), бензила (Bn), метилтиометилового эфира, MEM (bbb-метоксиэтоксиметилового эфира), DMT (диметокситритил, [бис-(4-метоксифенил)фенилметил]), MOM (метоксиметилэфир), MMT (метокситритил [(4-метоксифенил)дифенилметил]), PMP (п-метоксибензиловый эфир), Piv (пивалоил), THP (тетрагидропиранил), THF (тетрагидрофуран) и тритил (трифенилметил, Tr), и

X представляет собой галоген).

В другом аспекте настоящего изобретения настоящее изобретение обеспечивает способ профилактики или лечения аутоиммунного заболевания, который включает введение соединения, представленного

формулой 1 или его фармацевтически приемлемой соли нуждающемуся в этом субъекту

В другом аспекте настоящего изобретения настоящее изобретение обеспечивает применение вышеуказанного соединения, представленного формулой 1 или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для профилактики или лечения аутоиммунного заболевания

Полезный эффект

Производное гетероариламидопиридинола по настоящему изобретению проявляет превосходный эффект ингибирования TNF- α - или IL-6-индуцированной адгезии моноцитов к эпителиальным клеткам кишечника и, как доказано, оказывает терапевтический эффект на воспалительное заболевание кишечника и ревматоидный артрит *in vivo*. Таким образом, производное гетероариламидопиридинола можно успешно использовать для лечения аутоиммунного заболевания, в частности, воспалительного заболевания кишечника или ревматоидного артрита.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлен ряд диаграмм, показывающих результаты измерения эффекта восстановления слизистой оболочки кишечника в соответствии с лечением соединением по настоящему изобретению на животной модели воспалительного заболевания кишечника, индуцированного TNBS, в экспериментальном примере 3. Фиг. 1A: график, показывающий степень повреждения слизистой оболочки толстой кишки и восстановление с помощью оценки, фиг. 1B: изображения ткани толстой кишки, окрашенные гематоксилином и эозином.

На фиг. 2A представлена схематическая диаграмма, показывающая время введения лекарственного средства для измерения фармакологического эффекта соединения по настоящему изобретению на животной модели DSS-индуцированного хронического энтерита экспериментального примера 4.

На фиг. 2B представлен график, показывающий изменения массы тела в соответствии с лечением соединением по настоящему изобретению на животной модели DSS-индуцированного хронического энтерита экспериментального примера 4.

На фиг. 2C представлена диаграмма, показывающая морфологические изменения толстой кишки в соответствии с лечением соединением по настоящему изобретению на животной модели DSS-индуцированного хронического энтерита экспериментального примера 4.

На фиг. 2D представлен график, показывающий изменения массы кишечника в соответствии с лечением соединением по настоящему изобретению на животной модели DSS-индуцированного хронического энтерита экспериментального примера 4.

На фиг. 3A представлена схематическая диаграмма, показывающая время введения лекарственного средства для измерения фармакологического эффекта соединения по настоящему изобретению на животной модели DSS-индуцированного острого энтерита экспериментального примера 4.

На фиг. 3B представлен график, показывающий изменения массы тела в соответствии с лечением соединением по настоящему изобретению на животной модели DSS-индуцированного острого энтерита экспериментального примера 4.

На фиг. 3C представлена диаграмма, показывающая морфологические изменения толстой кишки в соответствии с лечением соединением по настоящему изобретению на животной модели DSS-индуцированного острого энтерита экспериментального примера 4.

На фиг. 3D представлен график, показывающий изменения массы кишечника в соответствии с лечением соединением по настоящему изобретению на животной модели DSS-индуцированного острого энтерита экспериментального примера 4.

На фиг. 4 представлен ряд диаграмм, показывающих степень повреждения слизистой оболочки кишечника путем окрашивания ткани кишечника гематоксилин-эозином после наблюдения за формой толстой кишки мыши в эксперименте по измерению зависимой от концентрации эффективности экспериментального примера 4. Фиг. 4A: график, показывающий результаты оценки и сравнения степени повреждения слизистой оболочки толстой кишки, фиг. 4B: изображения ткани толстой кишки, окрашенные гематоксилином и эозином после морфологического наблюдения.

На фиг. 5A представлен график, показывающий оценку артрита в соответствии с лечением соединением по настоящему изобретению на животной модели ревматоидного артрита экспериментального примера 5.

На фиг. 5B представлен график, показывающий изменения толщины лапы мыши в соответствии с лечением соединением по настоящему изобретению на животной модели ревматоидного артрита экспериментального примера 5.

На фиг. 5C представлен график, показывающий изменения массы тела мыши в соответствии с лечением соединением по настоящему изобретению на животной модели ревматоидного артрита экспериментального примера 5.

На фиг. 6 представлен набор фотографических изображений, показывающих недельное изменение степени артрита в соответствии с лечением соединением по настоящему изобретению на животной модели ревматоидного артрита экспериментального примера 5.

На фиг. 7 представлен ряд изображений, показывающих степень восстановления суставной ткани в соответствии с обработкой соединением по настоящему изобретению путем окрашивания гематоксили-

ном и эозином и окрашивания сафранином O на животной модели ревматоидного артрита экспериментального примера 5 в виде количественного показателя. Фиг. 7А: изображения, окрашенные гематоксилином и эозином, и изображения, окрашенные сафранином O, фиг. 7В: график, показывающий степень восстановления суставной ткани, преобразованную в количественный показатель.

На фиг. 8А представлен ряд графиков, показывающих результаты анализа общего количества иммунных клеток в селезенке в соответствии с лечением соединением по настоящему изобретению на животной модели ревматоидного артрита экспериментального примера 5.

На фиг. 8В представлен ряд графиков, показывающих результаты анализа количества воспалительных клеток в селезенке в соответствии с лечением соединением по настоящему изобретению на животной модели ревматоидного артрита экспериментального примера 5.

На фиг. 8С представляет собой ряд графиков, показывающих результаты анализа количества воспалительных клеток в дренирующем лимфатическом узле в соответствии с лечением соединением по настоящему изобретению на животной модели ревматоидного артрита экспериментального примера 5.

Описание предпочтительных вариантов осуществления

Далее настоящее изобретение описано подробно.

Варианты осуществления настоящего изобретения могут быть модифицированы в различных других формах, и объем настоящего изобретения не ограничивается вариантами осуществления, описанными ниже. Специалистам в данной области техники, обладающим средними знаниями в этой области, хорошо понятно, что варианты осуществления настоящего изобретения даны для более точного объяснения настоящего изобретения. Кроме того, "включение" элемента в описание не исключает других элементов, но может включать другие элементы, если специально не указано иное.

В одном аспекте настоящего изобретения настоящее изобретение обеспечивает соединение или его фармацевтически приемлемую соль, где соединение выбирают из

5-бром-N-(5-гидрокси-3,4,6-триметилпиридин-2-ил)-1Н-индол-2-карбоксамид;

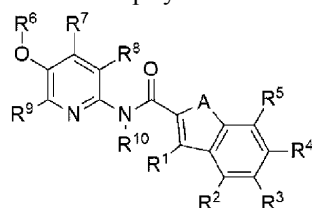
N-(5-гидрокси-3,4,6-триметилпиридин-2-ил)-5-метил-1Н-индол-2-карбоксамид;

3-хлор-6-фтор-N-(5-гидрокси-3,4,6-триметилпиридин-2-ил)бензо[b]тиофен-2-карбоксамид; и

3-хлор-6-фтор-N-(3,4,6-триметил-5-(2-оксо-2-(фениламино)этоксипиридин-2-ил)бензо[b]тиофен-2-карбоксамид;

где соединение представлено формулой 1

Формула 1



где в формуле 1

A, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹ и R¹⁰ выбраны из комбинации:

1) A представляет собой NH;

R¹, R², R⁴, R⁵, R⁶ и R¹⁰ представляют собой H;

R³ представляет собой Br; и

R⁷, R⁸ и R⁹ представляют собой CH₃;

2) A представляет собой NH;

R¹, R², R⁴, R⁵, R⁶ и R¹⁰ представляют собой H;

R³ представляет собой CH₃; и

R⁷, R⁸ и R⁹ представляют собой CH₃;

3) A представляет собой S; R¹ представляет собой Cl;

R², R³, R⁵, R⁶ и R¹⁰ представляют собой H;

R⁴ представляет собой F; и

R⁷, R⁸ и R⁹ представляют собой CH₃; и

4) A представляет собой S;

R¹ представляет собой Cl;

R², R³, R⁵ и R¹⁰ представляют собой H;

R⁴ представляет собой F;

R⁶ представляет собой -CH₂-C(O)-NH-фенил; и

R⁷, R⁸ и R⁹ представляют собой CH₃).

Соединение, представленное формулой 1 по настоящему изобретению, может быть использовано в виде фармацевтически приемлемой соли, в которой соль предпочтительно представляет собой кислотно-аддитивную соль, образованную фармацевтически приемлемыми свободными кислотами. Кислотно-аддитивную соль по настоящему изобретению можно получить с неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота, серная кислота, бромистоводо-

родная кислота, иодистоводородная кислота, азотистая кислота и фосфорная кислота; нетоксичными органическими кислотами, получая алифатический моно/дикарбоксилат, фенол-замещенный алканоат, гидроксилалканоат, алкандиоат, с ароматическими кислотами и алифатическими/ароматическими сульфокислотами; или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, бензойная кислота, лимонная кислота, молочная кислота, малеиновая кислота, глюконовая кислота, метансульфокислота, 4-толуолсульфокислота, винная кислота и фумаровая кислота. Примерами фармацевтически приемлемых нетоксичных солей являются сульфат, пиросульфат, бисульфат, сульфит, бисульфит, нитрат, фосфат, моногидрофосфат, дигидрофосфат, метафосфат, пирофосфат, хлорид, бромид, иодид, фторид, ацетат, пропионат, деканоат, каприлат, акрилат, формиат, изобутилат, капрат, гептаноат, пропионат, оксалат, малонат, сукцинат, суберат, себакат, фумарат, малеат, бутин-1,4-диоат, гексан-1,6-диоат, бензоат, хлорбензоат, метилбензоат, динитробензоат, гидроксibenзоат, метоксибензоат, фталат, терефталат, бензолсульфонат, толуолсульфонат, хлорбензолсульфонат, ксилолсульфонат, фенилацетат, фенилпропионат, фенилбутилат, цитрат, лактат, гидроксibuтилат, гликолят, малат, тартрат, метансульфонат, пропансульфонат, нафталин-1-сульфонат, нафталин-2-сульфонат и манделат.

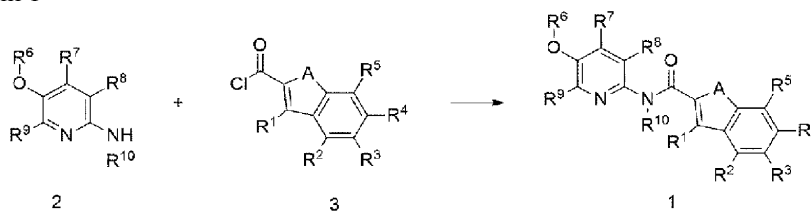
Кислотно-аддитивную соль по настоящему изобретению можно получить обычно обычным способом, известным специалистам в данной области. Например, производное, представленное формулой 1, растворяют в органическом растворителе, таком как метанол, этанол, ацетон, метилхлорид и ацетонитрил, в котором добавляют органическую кислоту или неорганическую кислоту, что приводит к выпадению осадка. Затем образовавшийся осадок отфильтровывают и сушат с получением соли. Или растворитель и избыточное количество кислоты отгоняют при пониженном давлении и сушат с получением соли. Или осадок кристаллизуют в органическом растворителе с получением соли.

Фармацевтически приемлемую соль металла можно получить при использовании основания. Соль щелочного металла или щелочноземельного металла получают следующим способом: растворяя соединение в избытке раствора гидроксида щелочного металла или раствора гидроксида щелочноземельного металла; отфильтровывая нерастворимую соль соединения; упаривая оставшийся раствор и высушивая его. На данной стадии соль металла предпочтительно получают в фармацевтически приемлемой форме соли натрия, калия или кальция. И соответствующую соль получают реакцией соли щелочного или щелочноземельного металла с подходящей солью серебра (например, нитратом серебра).

Соединение, представленное формулой 1 по настоящему изобретению, может быть получено в соответствии со способом получения, показанным в схеме реакции 1 или схеме реакции 2 ниже, но это только пример и не ограничивается этим, и каждая стадия получения может быть осуществлена с использованием способа, хорошо известного специалистам в данной области.

Соединение, представленное формулой 1, по настоящему изобретению может быть получено способом получения соединения, представленного формулой 1, включающим взаимодействие соединения, представленного формулой 2, с соединением, представленным формулой 3, как показано в схеме реакции 1 ниже:

Схема реакции 1



(в схеме реакции 1, A, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹ и R¹⁰ имеют значения, указанные для формулы 1).

Как показано в схеме реакции 1, амин соединения, представленного формулой 2, и Cl соединения, представленного формулой 3, взаимодействуют с получением соединения, представленного формулой 1, в котором образуется амидная связь. Вышеуказанная стадия может быть выполнена с использованием способа, хорошо известного специалистам в данной области, и соединение может быть получено в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, но это только пример и не ограничивается им. Соединение 3-хлор-6-фтор-N-(3,4,6-триметил-5-(2-оксо-2-(фениламино)этокси)пирдин-2-ил)бензо[b]тиофен-2-карбоксамид, представленное формулой 1 по настоящему изобретению, представленное формулой 1, где A представляет собой S; R¹ представляет собой Cl; R², R³ и R⁵ представляют собой H; R⁴ представляет собой F; R⁶ представляет собой -CH₂-C(O)-NH-фенил; R⁷, R⁸, и R⁹ представляют собой CH₃; R¹⁰ представляет собой H;

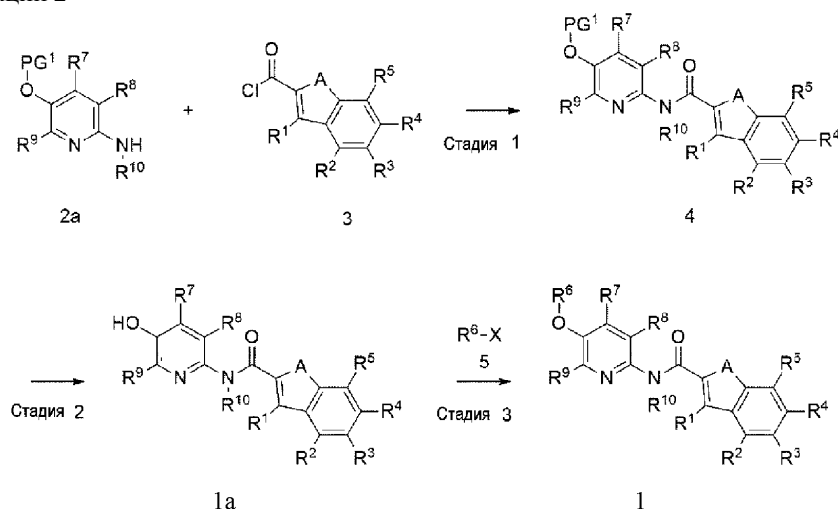
можно получить способом, включающим следующие стадии, как показано в схеме реакции 2 ниже:

получение соединения, представленного формулой 4, путем взаимодействия соединения, представленного формулой 2a, с соединением, представленным формулой 3 (стадия 1);

получение соединения, представленного формулой 1a, путем удаления защитной группы у соединения, представленного формулой 4, полученного на стадии 1 выше (стадия 2); и

получение соединения, представленного формулой 1, путем взаимодействия соединения, представленного формулой 1a, полученного на стадии 2 выше, с соединением, представленным формулой 5 (стадия 3):

Схема реакции 2



(в схеме реакции 2, соединение, представленное формулой 1 представляет собой 3-хлор-6-фтор-N-(3,4,6-триметил-5-(2-оксо-2-(фениламино)этокси)пиридин-2-ил)бензо[b]тиофен-2-карбоксамид, PG¹ представляет собой защитную группу для спирта, выбранную из группы, состоящей из ацетила (Ac), бензоила (Bz), бензила (Bn), метилтиометилового эфира, MEM (bbb-метоксиэтоксиметилового эфира), DMT (диметокситритил, [бис-(4-метоксифенил)фенилметил]), MOM (метоксиметилловый эфир), MMT (метокситритил [(4-метоксифенил)дифенилметил]), PMP (п-метоксибензиловый эфир), Piv (пивалоил), THP (тетрагидропиранил), THF (тетрагидрофуран) и тритил (трифенилметил, Tr); и X представляет собой галоген).

Как показано на стадии 1 формулы реакции 2, амин соединения, представленного формулой 2a, и Cl соединения, представленного формулой 3, взаимодействуют с получением соединения, представленного формулой 4, в котором образуется амидная связь. Вышеуказанная стадия может быть выполнена с использованием способа, хорошо известного специалистам в данной области, и соединение может быть получено в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, но это только пример и не ограничивается им.

Стадия 2 формулы реакции 2 представляет собой стадию получения спиртового соединения, представленного формулой 1a, путем удаления защитной группы спирта соединения, представленного формулой 4. Стадия может быть осуществлена в соответствии с известным способом, обеспечивающим удаление защитной группы спирта, и специалисты в данной области могут легко выбрать и получить, на каких условиях реакцию удаления можно проводить в соответствии с типом защитной группы. Соединение можно получить в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, но это только пример и не ограничивается им.

Стадия 3 схемы 2 представляет собой стадию получения соединения, представленного формулой 1, путем взаимодействия гидроксила соединения, представленного формулой 1a, с галогенидом соединения, представленного формулой 4. Вышеуказанная стадия может быть выполнена с использованием способа, хорошо известного специалистам в данной области, и соединение может быть получено в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, но это только пример и не ограничивается им.

Соединение может ингибировать адгезию моноцитов к эпителиальным клеткам кишечника посредством TNF-α или IL-6.

Аутоиммунное заболевание может быть по меньшей мере одним, выбранным из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника, астмы, диабета 1 типа, ревматоидного артрита, ревматической полимиалгии, анкилозирующего спондилита, псориазического артрита, псориаза, экземы, склероза, витилиго, рассеянного склероза, IL-17-индуцированной деменции, периферического неврита, увеита, полимиозита/дерматомиозита, аутоиммунной цитопении, аутоиммунного миокардита, атопического дерматита, первичного цирроза, синдрома сухого глаза, фибромиалгии, синдрома Гудпасчера, аутоиммунного менингита, синдрома Шегрена, системной красной волчанки, болезни Аддисона, очаговой алопеции, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного паротита, дистрофического буллезного эпидермолиза, эпидидимита, гломерулонефрита, болезни Грейвса, глютеновой болезни, синдрома Гийена-Барре, болезни Хашимото, гемолитической анемии, миастении гравис, бокового амиотрофического склероза, вульгарного пемфигуса, ревматической лихорадки, саркоидоза, склероза кожи, спондилоартроза, тиреоидита, васкулита, витилиго, микседемы, пернициозной анемии, антифосфолипидного синдрома, позднего и хронического отторжения трансплантата солидных органов и реакции "трансплантат против хозяина".

Воспалительное заболевание кишечника может быть любым, выбранным из группы, состоящей из энтерита, колита, язвенного энтерита, болезни Крона, цитомы Крона, синдрома раздраженного кишечника, геморрагической язвы прямой кишки, паучита, пептической язвы, кишечной болезни Бехчета и гаст-

рита.

В фармацевтической композиции по настоящему изобретению соединение, представленное формулой 1, или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально или парентерально, предпочтительно парентерально, и использовать в общих формах фармацевтических композиций. То есть соединение или его фармацевтически приемлемая соль могут быть получены для перорального или парентерального введения путем смешивания с обычно используемыми разбавителями или эксципиентами, такими как наполнители, экстендеры, связующие, смачивающие агенты, разрыхлители и поверхностно-активные вещества. Твердые лекарственные формы для перорального введения представляют собой таблетки, пилюли, порошки, гранулы и капсулы. Эти твердые лекарственные формы получают путем смешивания одного или нескольких соединений с одним или несколькими подходящими эксципиентами, такими как крахмал, карбонат кальция, сахароза или лактоза, желатин и т.п. Кроме простых эксципиентов, можно использовать скользкие вещества, например стеарат магния, тальк и т.п. Жидкие лекарственные формы для перорального введения представляют собой суспензии, растворы, эмульсии и сиропы, и вышеупомянутые лекарственные формы могут содержать различные эксципиенты, такие как смазывающие агенты, подсластители, ароматизаторы и консерванты в дополнение к обычно используемым простым разбавителям, таким как вода и жидкий парафин. Лекарственные формы для парентерального введения представляют собой стерилизованные водные растворы, водонерастворимые эксципиенты, суспензии и эмульсии. Нерастворимые в воде эксципиенты и суспензии могут содержать, помимо активного соединения или соединений, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительное масло, такое как оливковое масло, сложный эфир для инъекций, такой как этилолеат и т.п.

Фармацевтическая композиция, содержащая соединение, представленное формулой 1, или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного ингредиента, может быть введена парентерально, и парентеральное введение включает подкожную инъекцию, внутривенную инъекцию, внутримышечную инъекцию или внутригрудную инъекцию.

В настоящее время, для получения соединения, представленного формулой 1, или его фармацевтически приемлемой соли в виде лекарственной формы для парентерального введения, соединение, представленное формулой 1, или его фармацевтически приемлемую соль смешивают со стабилизатором или буферным агентом в воде для получения раствора или суспензии, которые затем помещают в ампулы или флаконы. Композиция в настоящем документе может быть стерилизована и дополнительно содержать консерванты, стабилизаторы, смачивающиеся порошки или эмульгаторы, соли и/или буферы для регулирования осмотического давления и другие терапевтически полезные вещества, и композиция может быть получена обычным способом смешивания, гранулирования или нанесения покрытия.

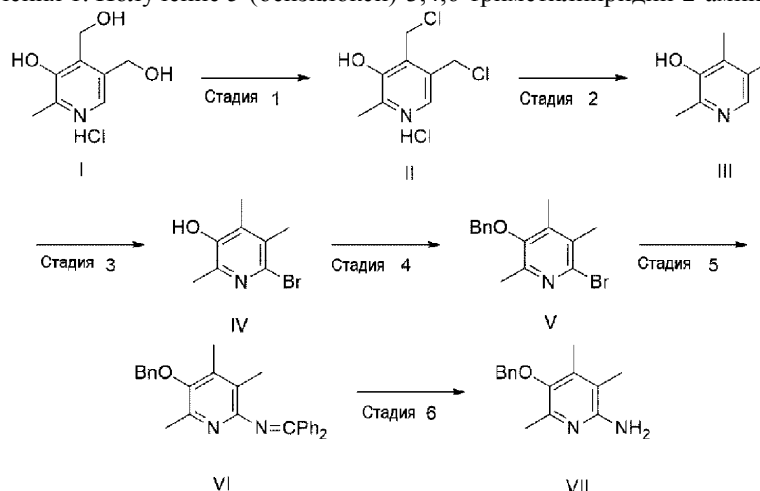
Лекарственные формы для перорального введения представлены таблетками, пилюлями, твердыми/мягкими капсулами, растворами, суспензиями, эмульсиями, сиропами, гранулами, эликсирами и пастилками и т.п. Эти лекарственные формы могут включать разбавители (например, лактозу, декстрозу, сахарозу, маннит, сорбит, целлюлозу и/или глицин) и скользкие вещества (например, диоксид кремния, тальк, стеарат и его соли магния или кальция и/или полиэтиленгликоль) в дополнение к активному ингредиенту. Таблетки могут включать связующие агенты, такие как алюмосиликат магния, крахмальная паста, желатин, метилцеллюлоза, натрий карбоксиметилцеллюлоза и/или поливинилпирролидон, и при необходимости к этому могут быть включены разрыхлители, такие как крахмал, агароза, альгиновая кислота или ее натриевая соль или азеотропные смеси и/или абсорбенты, красители, ароматизаторы и подсластители.

В другом аспекте настоящего изобретения настоящее изобретение обеспечивает способ профилактики или лечения аутоиммунного заболевания, который включает введение соединения, представленного формулой 1 его фармацевтически приемлемой соли нуждающемуся в этом субъекту.

В другом аспекте настоящего изобретения настоящее изобретение обеспечивает применение соединения, представленного формулой 1 или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для профилактики или лечения аутоиммунного заболевания.

Далее настоящее изобретение будет подробно описано с помощью нижеследующих примеров и экспериментальных примеров. Однако нижеследующие примеры и экспериментальные примеры предназначены только для иллюстрации настоящего изобретения, и содержание настоящего изобретения ими не ограничивается.

Пример получения 1. Получение 5-(бензилокси)-3,4,6-триметилпиридин-2-амина.



Стадия 1. Синтез 4,5-бис(хлорметил)-2-метилпиридин-3-ол гидрохлорид (формула II).

SOCl_2 (15 мл) и DMF (0,38 мл) добавляли к пиридоксингидрохлориду (формула I) (10 г) и смесь перемешивали при 80°C в течение 30 мин. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, добавляли Et_2O (140 мл) и смесь перемешивали при охлаждении льдом в течение 1 ч. Осажденное в реакционном растворе твердое вещество отфильтровывали при пониженном давлении, отфильтрованное твердое вещество промывали Et_2O и сушили с получением целевого соединения II (11,3 г) в виде белого твердого вещества.

^1H -ЯМР ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8,42 (с, 1H), 4,99 (с, 2H), 4,96 (с, 2H), 2,63 (с, 3H).

Стадия 2. Синтез 2,4,5-триметилпиридин-3-ола (формула III).

Порошок цинка (8,08 г) добавляли небольшими порциями к суспензии уксусной кислоты (50 мл) соединения II (10 г) несколько раз и смесь перемешивали с обратным холодильником при 130°C в течение 2 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, и твердое вещество в реакционном растворе удаляли фильтрованием при пониженном давлении. Затем pH фильтрата доводили до 6 с помощью 10 М раствора NaOH. Фильтрат насыщали солью, а затем несколько раз экстрагировали EtOAc. Экстракт промывали насыщенным солевым раствором, сушили над безводным MgSO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=20:1$) с получением целевого соединения III (5,2 г) в виде белого твердого вещества.

^1H -ЯМР ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8,49 (с, 1H), 7,72 (с, 1H), 2,31 (с, 3H), 2,12 (с, 3H), 2,08 (с, 3H).

Стадия 3. Синтез 6-бром-2,4,5-триметилпиридин-3-ола (формула IV).

1,3-Дибром-5,5-диметилгидантоин (DBDMH, 2,5 г) добавляли к суспензии THF (30 мл) соединения III (2,5 г), с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение 3 часов. После концентрирования реакционной смеси, остаток разбавляли EtOAc и водой, и водный слой экстрагировали EtOAc. Раствор EtOAc промывали насыщенным солевым раствором, сушили над безводным MgSO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (EtOAc:Гексаны=1:4) с получением целевого соединения IV (3,22 г) в виде бледно-желтого твердого вещества.

^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 5,56 (шир.с, 1H), 2,42 (с, 3H), 2,31 (с, 3H), 2,25 (с, 3H).

Стадия 4. Синтез 3-(бензилокси)-6-бром-2,4,5-триметилпиридина (формула V).

K_2CO_3 (20,78 г) и бензилхлорид (5,2 мл) последовательно добавляли к раствору DMF (15 мл) соединения IV (6,5 г), с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение 12 часов. Реакционный раствор разбавляли EtOAc и промывали несколько раз небольшим количеством воды. Раствор EtOAc промывали насыщенным солевым раствором, сушили над безводным MgSO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (EtOAc:Гексаны=1:20) с получением целевого соединения V (8,9 г) в виде белого твердого вещества.

^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,38-7,43 (м, 5H), 4,77 (с, 2H), 2,46 (с, 3H), 2,32 (с, 3H), 2,24 (с, 3H).

Стадия 5. Синтез 5-(бензилокси)-N-(дифенилметил)-3,4,6-триметилпиридин-2-амина (формула VI).

Бензофенонимин (1,73 мл) добавляли к толуольному (30 мл) раствору соединения V (3 г), трис(дибензильденацетон)дипалладий(0) (203 мг), 2,2'-бис(дифенилфосфино)-1,1'-бинафтила (249 мг) и Na^tBu (1,36 г), и смесь перемешивали с обратным холодильником в течение 12 часов. Реакционный раствор охлаждали до комнатной температуры, и разбавляли EtOAc и водой. Раствор EtOAc промывали несколько раз насыщенным солевым раствором, сушили над безводным MgSO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (EtOAc:Гексаны=1:4) с получением целевого соединения VI (3,28 г) в виде желтого твердого вещества.

^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,80 (д, $J=7,1$ Гц, 2H), 7,17-7,48 (м, 13H), 4,69 (с, 2H), 2,29 (с, 3H), 2,03 (с, 3H),

1,91 (с, 3H).

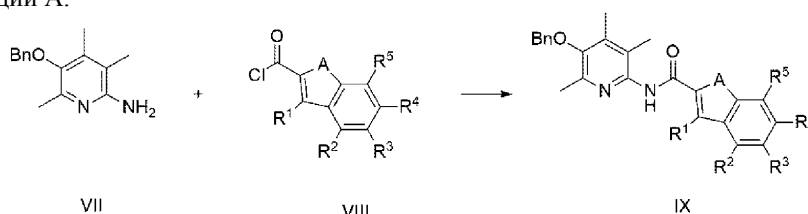
Стадия 6. Синтез 5-(бензилокси)-3,4,6-триметилпиридин-2-амин (формула VII).

Раствор, в котором ацетилхлорид (3,2 мл) добавляли понемногу к метанолу (20 мл) при охлаждении льдом, добавляли к смешанному раствору метанола (60 мл)-ТНП (20 мл) соединения VI (7,7 г), с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение 12 часов. После концентрирования реакционного раствора при пониженном давлении, остаток разбавляли EtOAc и промывали несколько раз насыщенным раствором гидрокарбоната натрия. Раствор EtOAc промывали насыщенным соевым раствором, сушили над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (CHCl₃:MeOH=20:1) с получением целевого соединения VII (4,36 г) в виде бледно-желтого твердого вещества.

¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,31-7,45 (м, 5H), 4,68 (с, 2H), 4,25 (шир.с, 1H), 2,34 (с, 3H), 2,16 (с, 3H), 1,99 (с, 3H).
Общая процедура получения 1 примеров.

В соответствии со способом получения схемы реакции А получали соединение формулы IX-01.

Схема реакции А.



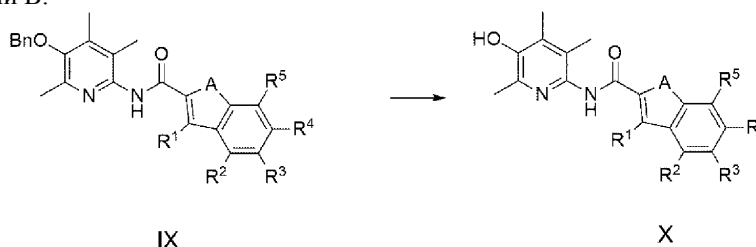
В схеме реакции А выше, А, R¹, R², R³, R⁴ и R⁵ имеют значения, как определено в настоящем описании.

В частности, соединение VIII (1,5~2,0 ммоль) и Et₃N (2,0 ммоль) последовательно добавляли к раствору CH₂Cl₂ (или ClCH₂CH₂Cl, 10 мл) соединения VII (1,0 ммоль) при комнатной температуре, и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре ~60°C до исчезновения соединения (VII) по данным TLC. Реакционную смесь разбавляли CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Раствор CH₂Cl₂ сушили над безводным MgSO₄, фильтровали, концентрировали при пониженном давлении, и остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле с получением соединения IX.

Общая процедура получения 2 примеров.

В соответствии со способом получения схемы реакции В, ниже, получали соединения примеров 33, 35, 50 (соединения X-07, X-09, X-24).

Схема реакции В.



В схеме реакции В выше, А, R¹, R², R³, R⁴ и R⁵ имеют значения, как определено в настоящем описании.

Пентаметилбензол (3,0 ммоль) добавляли к CH₂Cl₂ (10 мл) соединения IX (1,0 ммоль), и реакционный раствор охлаждали льдом. Медленно добавляли раствор CH₂Cl₂ (2,0 ммоль) 1 М ВCl₃, и реакционную смесь перемешивали при охлаждении льдом до исчезновения соединения IX по данным TLC. К реакционному раствору добавляли 10 мл смешанного раствора 9:1 CHCl₃ и MeOH, перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут, и затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле с получением соединений X-07, X-09, X-24.

Пример 33. Синтез 5-бром-N-(5-гидрокси-3,4,6-триметилпиридин-2-ил)-1Н-индол-2-карбоксамид (формула X-07).

Целевое соединение получали в соответствии со способом общей процедуры получения 2 примеров.

¹H-ЯМР ((CD₃)₂SO) δ 11,85 (с, 1H), 10,31 (с, 1H), 8,61 (с, 1H), 7,87 (д, J=1,2 Гц, 1H), 7,35 (дд, J=9,5, 7,8 Гц, 3H), 2,35 (с, 3H), 2,18 (с, 3H), 2,05 (с, 3H).

Пример 35. Синтез N-(5-гидрокси-3,4,6-триметилпиридин-2-ил)-5-метил-1Н-индол-2-карбоксамид (формула X-09).

Целевое соединение получали в соответствии со способом общей процедуры получения 2 примеров.

¹H-ЯМР ((CD₃)₂SO) δ 11,54 (д, J=1,1 Гц, 1H), 10,22 (с, 1H), 8,63 (с, 1H), 7,41 (с, 1H), 7,30 (дд, J=12,6, 4,9 Гц, 2H), 7,03 (дд, J=8,4, 1,4 Гц, 1H), 2,36 (д, J=8,1 Гц, 6H), 2,17 (с, 3H), 2,04 (с, 3H).

Пример 50. Синтез 3-хлор-6-фтор-N-(5-гидрокси-3,4,6-триметилпиридин-2-ил)бензо[б]тиофен-2-карбоксамид (формула X-24).

Целевое соединение получали в соответствии со способом общей процедуры получения 2 примеров.

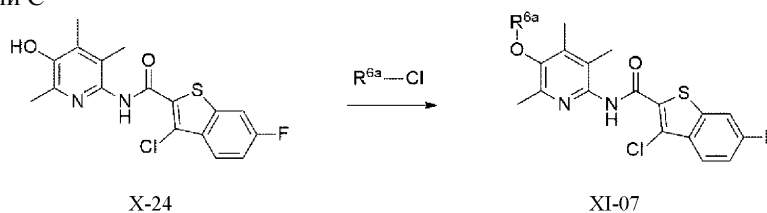
¹H-ЯМР ((CD₃)₂SO) δ 10,40 (с, 1H), 9,12 (с, 1H), 8,10 (дд, J=9,1, 2,3 Гц, 1H), 7,96 (дд, J=9,0, 5,1 Гц,

1H), 7,49 (тд, J=9,0, 2,4 Гц, 1H), 2,40 (с, 3H), 2,23 (с, 3H), 2,14 (с, 3H).

Общая процедура получения 3 примеров.

В соответствии со способом получения схемы реакции С, ниже, получали соединения примера 59 (соединение XI-07).

Схема реакции С



В схеме реакции С выше,

R^{6a} представляет собой $-(CH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_nR^b$, и m , n и R^b имеют значения, как определено в настоящем описании.

NaH (0,3 ммоль) и N-замещенный-2-хлорацетамид (0,2 ммоль) последовательно добавляли к раствору DMF (1 мл) соединения X-24 (0,1 ммоль), с последующим перемешиванием при комнатной температуре до исчезновения соединения X-24 по данным TLC. Реакционную смесь разбавляли EtOAc и промывали водой и насыщенным соевым раствором. Раствор EtOAc сушили над безводным $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле с получением соединения XI-07.

Пример 59. Синтез 3-хлор-6-фтор-N-(3,4,6-триметил-5-(2-оксо-2-(фениламино)этокси)пиридин-2-ил)бензо[b]тиофен-2-карбоксамид (формула XI-07).

Целевое соединение получали в соответствии со способом общей процедуры получения 3 примеров.

1H -ЯМР ($(CD_3)_2SO$) δ 10,53 (с, 1H), 10,14 (с, 1H), 8,13 (дд, J=9,0, 2,3 Гц, 1H), 7,98 (дд, J=8,9, 5,1 Гц, 1H), 7,76-7,70 (м, 2H), 7,52 (тд, J=9,0, 2,4 Гц, 1H), 7,40-7,33 (м, 2H), 7,15-7,09 (м, 1H), 4,49 (с, 2H), 2,45 (с, 3H), 2,32 (с, 3H), 2,16 (с, 3H).

Номера, химические структуры и названия соединений по настоящему изобретению, полученных выше, обобщены в табл. 1 ниже.

Таблица 1

Номер	Пример	Структура	Название
X-07	33		5-бром-N-(5-гидрокси-3,4,6-триметилпиридин-2-ил)-1H-индол-2-карбоксамид
X-09	35		N-(5-гидрокси-3,4,6-триметилпиридин-2-ил)-5-метил-1H-индол-2-карбоксамид
X-24	50		3-хлор-6-фтор-N-(5-гидрокси-3,4,6-триметилпиридин-2-ил)бензо[b]тиофен-2-карбоксамид
XI-07	59		3-хлор-6-фтор-N-(3,4,6-триметил-5-(2-оксо-2-(фениламино)этокси)пиридин-2-ил)бензо[b]тиофен-2-карбоксамид

Экспериментальный пример 1. Анализ на активность в отношении ингибирования адгезии моноцитов и эпителиальных клеток кишечника, индуцированной TNF- α .

Способ анализа.

Эпителиальные клетки рака толстой кишки человека HT-29 и моноциты человеческого происхождения U937 культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина (PS), в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂. Когда клетки разрастались более чем на 80% площади дна культурального флакона, их пассировали в соотношении 1:3 и использовали в данном эксперименте. Клетки HT-29 культивировали в 24-луночном планшете при плотности 2×10^5 клеток/см², и исследуемый препарат предварительно обрабатывали в среде, содержащей 1% FBS и 1% PS в течение 1 ч. Затем обрабатывали 10 мкг/мл ВСЕCF-АМ и подвергали реакции при 37°C в течение 30 минут. Клетки U937, нагруженные ВСЕCF и TNF- α (10 нг/мл), подвергали взаимодействию с клетками HT-29, предварительно обрабо-

танними исследуемым препаратом, при 37°C в течение 3 часов. По завершении реакции среду удаляли, а культуральный флакон дважды промывали PBS для удаления неприлипших клеток U937. На следующей стадии клетки лизировали обработкой 0,1% Triton X-100 (0,1 М Tris) и подвергали взаимодействию при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем измеряли флуоресценцию и количественно определяли ее с помощью микропланшет-ридера fluostar optima (BMG Labtechnologies, Germany) (Carvalho et al., 1996; Thapa et al., 2008).

Carvalho, D., Savage, C.O., Black, C.M. and Pearson, J.D., IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *J. Clin. Invest.* 97, 111-119 (1996).

Thapa, D., Lee, J.S., Park, S.Y., Bae, Y.H., Bae, S.K., Kwon, J.B., Kim, K.J., Kwak, M.K., Park, Y.J., Choi, H.G. and Kim, J.A., Clotrimazole Ameliorates Intestinal Inflammation and Abnormal Angiogenesis by Inhibiting Interleukin-8 Expression through a Nuclear Factor- κ B-Dependent Manner. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 327, 353-364 (2008).

Таблица 2

Соединение	ингибирующая активность (%)
5-ASA	3,8
X-07	88,9
X-09	82,8
X-24	90,3
XI-07	84,1

Как показано в табл. 2, иллюстрирующей результаты исследования ингибирующей активности исследуемого препарата (1 мкМ) в отношении адгезии эпителиальных клеток кишечника (HT-29) и моноцитарных клеток (U937), индуцированной TNF- α , степень ингибирования 5-ASA (положительный контроль), активный метаболит сульфасалазина, который в настоящее время используется в клинических испытаниях для лечения воспалительного заболевания кишечника, составлял 3,8%, демонстрируя небольшой эффект, тогда как соединение X-24 по настоящему изобретению проявляло степень ингибирования 90,3%, демонстрируя очень превосходную активность.

Кроме того, соединение X-07 показало степень ингибирования 88,9%, соединение XI-07 показало степень ингибирования 84,1%, соединение X-09 показало степень ингибирования 82,8%.

Из приведенных выше результатов было подтверждено, что соединение, представленное формулой 1, по настоящему изобретению можно эффективно использовать для лечения воспалительное заболевание кишечника, и можно видеть, что соединение по настоящему изобретению можно использовать в качестве заменителя существующих лекарственных средств.

Экспериментальный пример 2. Анализ на активность в отношении ингибирования адгезии моноцитов и эпителиальных клеток кишечника, индуцированной IL-6.

Способ анализа.

Анализ на ингибирующую активность адгезии кишечных эпителиальных клеток к моноцитам с помощью I IL-6 проводили с использованием того же метода, что и в случае TNF- α . Клетки HT-29 культивировали в 24-луночном планшете при плотности 2×10^5 клетки/см², и исследуемый препарат предварительно обрабатывали в среде, содержащей 1% FBS и 1% PS в течение 1 ч. Затем обрабатывали 10 мкг/мл ВСЕСФ-АМ и подвергали реакции при 37°C в течение 30 минут. Клетки U937, нагруженные ВСЕСФ и IL-6 (10 нг/мл), подвергали взаимодействию с клетками HT-29, предварительно обработанными исследуемым препаратом, при 37°C в течение 3 часов. По завершении реакции среду удаляли, а культуральный флакон дважды промывали PBS для удаления неприлипших клеток U937. На следующей стадии клетки лизировали обработкой 0,1% Triton X-100 (0,1 М Tris) и подвергали взаимодействию при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем измеряли флуоресценцию и количественно определяли ее с помощью микропланшет-ридера fluostar optima (BMG Labtechnologies, Germany).

Таблица 3

Соединение	ингибирующая активность (%)
5-ASA	< 1,7
Тофацитиниб	49,1
X-07	80,3
X-09	71,7
X-24	79,2
XI-07	72,8

Как показано в табл. 3, иллюстрирующей результаты исследования ингибирующей активности исследуемого препарата (1 мкМ) в отношении адгезии эпителиальных клеток кишечника (HT-29) и моноцитарных клеток (U937), индуцированной IL-6, степень ингибирования существующего препарата 5-ASA, составляла менее 1,7% при концентрации 1 мкМ, показывая небольшой эффект, тогда как тофацитиниб показал степень ингибирования 49,1%.

Степень ингибирования соединения X-07 по настоящему изобретению составила 80,3%, демонстрируя очень хорошую активность. Кроме того, соединение X-24 показало степень ингибирования 79,2%, соединение XI-07 показало степень ингибирования 72,8%, соединение X-09 показало степень ингибирования 71,7%.

Результаты (IC_{50}) исследования ингибирующей активности двух соединений, обладающих превосходной активностью в отношении адгезии эпителиальных клеток кишечника и моноцитарных клеток, индуцированной TNF- α и IL-6, показаны в табл. 4 ниже.

Таблица 4

Соединение	TNF- α (IC_{50})	IL-6 (IC_{50})
5-ASA	18,1 мМ	25,1 мМ
Тофацитиниб	0,70 мкМ	0,44 мкМ
X-09	0,30 мкМ	0,34 мкМ
X-24	0,23 мкМ	0,35 мкМ

Как показано в табл. 4, в случае использования 5-ASA в качестве контрольного препарата IC_{50} для ингибирования адгезии под действием TNF- α составляла 18,1 мМ, а IC_{50} для ингибирования адгезии под действием IL-6 составляла 25,1 мМ. С другой стороны, в случае соединения X-09 по настоящему изобретению IC_{50} для ингибирования адгезии TNF- α и IL-6 составляли 0,30 мкМ и 0,34 мкМ, соответственно. В случае соединения X-24 IC_{50} для ингибирования адгезии TNF- α и IL-6 составляли 0,23 мкМ и 0,35 мкМ, соответственно. Соединения X-09 и X-24 соответственно продемонстрировали превосходную активность, которая в десятки тысяч раз превышала активность 5-ASA, а также показали более высокую активность по сравнению с активностью тофацитиниба.

Из приведенных выше результатов было подтверждено, что соединение, представленное формулой 1, по настоящему изобретению можно эффективно использовать для лечения воспалительного заболевания кишечника, и можно видеть, что соединение по настоящему изобретению можно использовать в качестве заменителя существующих лекарственных средств.

Экспериментальный пример 3. Тест эффективности *in vivo* при пероральном введении соединений в модели TNBS-индуцированного воспалительного воспаления кишечника у крыс.

Способ анализа.

Крыс Sprague Dawley в возрасте 7-8 недель приобретали у OrientBio (Korea), стабилизировали обычным твердым кормом в течение 3 дней, а затем использовали в настоящем эксперименте. Корм и вода были в свободном доступе в течение периода эксперимента, а температуру в помещении для разведения поддерживали при $25 \pm 1^\circ\text{C}$, и относительную влажность при $50 \pm 10\%$. Управление освещением контролировали в 12-часовом цикле свет-темнота с помощью автоматического контроллера освещения. Экспериментальные группы разделяли на 5 групп (контрольная группа, группа, получавшая только TNBS, группа, получавшая TNBS+сульфасалазин (300 мг/кг), группа, получавшая TNBS+тофацитиниб (30 мг/кг), группа, получавшая TNBS+испытуемое лекарственное средство (1 мг/кг)), по 6 животных в каждой группе и средней массой тела 180 ± 10 г в соответствии со схемой рандомизированных блоков.

(1) Индуцирование энтерита ректальным введением TNBS.

После анестезии диэтиловым эфиром, крысам, которые голодали в течение 24 ч, 0,8 мл 5% TNBS,

разбавленного 50% об/об этанола, медленно вводили в просвет толстой кишки с помощью шприца объемом 1 мл, соединенного с полиэтиленовым катетером, и затем крыс оставляли на левой стороне в течение 60 секунд в перевернутом положении, для предотвращения просачивания 5% TNBS в задний проход. В контрольной группе вводили только носитель (этанол 50% об./об.) таким же образом, как и в других группах (Thara et al., 2008).

(2) Введение лекарственного средства.

Для изучения эффекта лекарственного средства лекарственное средство вводили в постоянное время каждый день в течение 5 дней со дня после введения TNBS.

(3) Наблюдение за массой.

Изменения массы тела каждой крысы наблюдали от стадии голодания до введения TNBS и процесса введения лекарственного средства с использованием цифрового измерителя массы.

(4) Измерение массы толстой кишки.

Толстую кишку крысы извлекали, ткань на расстоянии 5-6 см от ануса разрезали на длину 1 см и измеряли массу ткани.

(5) Окрашивание ткани толстой кишки и измерение повреждения слизистой оболочки.

Взвешенные ткани крыс фиксировали 4% раствором параформальдегида, а затем переносили в 30% раствор сахарозы. Когда ткани оседали, их извлекали и нарезали толщиной 25 мкм с использованием криомикротомы (Microm HM 450, Thermo Fisher Scientific, Germany) и хранили в растворе для криоконсервации. После промывания среза ткани KPBS срез ткани прикрепляли к предметному стеклу, сушили, и затем окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали под микроскопом. Степень повреждения и восстановления слизистой оболочки оценивали, как показано в табл. 5 ниже, и было подтверждено общее количество баллов, равное 6 баллам на крысу.

Таблица 5

Повреждение слизистой оболочки толстой кишки	Баллы
1) Инфильтрация воспалительных клеток	
Случайные воспалительные клетки в собственной пластинке	0
Увеличенное количество воспалительных клеток в собственной пластинке	1
Слияние воспалительных клеток, проникающих в подслизистую оболочку	2
Трансмуральное распространение инфильтрата	3
2) Повреждение тканей	
Нет повреждения слизистой	0
Дискретные лимфоэпителиальные поражения	1
Поверхностная эрозия слизистой оболочки или очаговое изъязвление	2
Обширное повреждение слизистой оболочки и распространение в более глубокие структуры стенки кишечника	3

Анализ эффекта перорального введения соединений на TNBS-индуцированный энтерит.

Ингибирующую активность в отношении энтерита *in vivo* при фиксированной дозе (1 мг/кг) соединений, демонстрирующих превосходную активность в тесте ингибирования адгезии *in vitro*, измеряли как степень восстановления массы кишечника и степень восстановления массы тела, и результаты представлены в табл. 6. Кроме того, дозозависимая активность соединения X-09 показана в табл. 7.

Таблица 6

Соединение	Доза	Степень восстановления массы кишечника (%)	Степень восстановления массы тела (%)
Сульфасалазин	300 мг/кг	69,6	86,6
X-24	1 мг/кг	97,4	86,6
X-07	1 мг/кг	94,9	72,9
X-09	1 мг/кг	94,0	72,7
XI-07	1 мг/кг	91,0	82,9

Таблица 7

Соединение	Доза	Степень восстановления массы кишечника (%)	Степень восстановления массы тела (%)
Сульфасалазин	300 мг/кг	69,6	86,6
Триамцинолон	10 мг/кг	84,5	70,0
X-09	0,3 мг/кг	47,0	17,2
X-09	1 мг/кг	85,2	69,3
X-09	3 мг/кг	91,7	74,6
X-09	10 мг/кг	98,9	80,8

1. Изменение массы.

В модели колита, при которой воспаление кишечника индуцировали обработкой 5% TNBS у крыс массой 180-190 г, наблюдали изменение массы тела в определенное время каждый день в течение 5 дней в зависимости от массы тела до обработки TNBS. В результате масса тела крыс контрольной группы, обработанных носителем, продолжала увеличиваться, а масса крыс группы, обработанной TNBS, продолжала уменьшаться, и масса тела немного восстанавливалась с 5-го дня, но масса тела была значительно снижена по сравнению с крысами нормальной группы. Масса тела крыс, получавших 300 мг/кг сульфасалазина, группа положительного контроля, постепенно восстанавливалась, и, хотя масса тела была снижена по сравнению с массой тела крыс контрольной группы, получавших носитель, она была значительно увеличивалась по сравнению с массой тела крыс, получавших только TNBS, что приводило к степени восстановления массы 50,5%. Пиридиновые соединения показали степень восстановления 60,2% ~86,6% при введении 1 мг/кг. Соединения перечислены в порядке превосходной степени восстановления массы следующим образом: соединения X-24, XI-07, X-07, X-09. Для соединения X-09, дозозависимую активность измеряли путем добавления 10 мг/кг триамцинолона в дополнение к 300 мг/кг сульфасалазина, положительный контроль. В результате было подтверждено, что соединение X-09 проявляло дозозависимую активность по восстановлению массы тела и было более эффективным, чем триамцинолон в той же концентрации.

2. Морфологическое исследование.

Через 5 дней после введения лекарственного средства толстую кишку извлекали и визуально осматривали. В результате в толстой кишке крыс, получавших TNBS, наблюдался отек и гиперемия по сравнению с крысами контрольной группы, а также наблюдали отек и застой червеобразного отростка и спайки тканей кишечника. В группе, получавшей 300 мг/кг сульфасалазин, группе положительного контроля, симптомы, наблюдаемые невооруженным глазом, а также спайки между другими органами и застойные явления в толстой кишке также были значительно подавлены. В группе, получавшей пиридиновое соединение, симптомы улучшились больше, чем в группе, получавшей 300 мг/кг сульфасалазина. Также было подтверждено, что соединение X-09 проявляло дозозависимую терапевтическую активность при энтеритах и было более эффективным, чем триамцинолон в той же концентрации.

3. Измерение массы толстой кишки.

Степень воспаления толстой кишки крыс является ключевой шкалой (важным показателем) прогрессирования IBD, более важным, чем изменение массы тела. Извлекали толстую кишку и измеряли массу ткани на расстоянии 5-6 см от ануса. В результате масса толстой кишки с отеком была значительно увеличена у крыс из группы, получавшей только TNBS, по сравнению с крысами контрольной группы, получавшей носитель. У крыс группы, получавшей 300 мг/кг сульфасалазина, положительный контроль, степень восстановления массы ткани толстой кишки составила 69,6%. Пиридиновое соединения показали степень восстановления 79,8% ~ 97,4% при введении 1 мг/кг. Соединения перечислены в порядке превосходной степени восстановления массы следующим образом: соединения X-24, XI-07, X-07, X-09. Также было подтверждено, что соединение X-09 проявляло дозозависимую активность по восстановлению массы тела и было более эффективным, чем триамцинолон в той же концентрации.

4. Измерение восстановления повреждения слизистой оболочки толстой кишки крысы.

После наблюдения за морфологией толстой кишки в эксперименте по измерению дозозависимой активности было проведено окрашивание ткани толстой кишки гематоксилин-эозином для оценки и сравнения степени повреждения слизистой оболочки толстой кишки. В результате было подтверждено, что соединение X-09 проявляет дозозависимую активность восстановления повреждения слизистой оболочки и является более эффективным, чем триамцинолон в той же концентрации (фиг. 1).

Из результатов экспериментального примера 3 было подтверждено, что соединение, представленное формулой 1, по настоящему изобретению можно эффективно использовать для лечения воспалительного заболевания кишечника, и можно видеть, что соединение по настоящему изобретению можно использовать в качестве заменителя существующих лекарственных средств.

Экспериментальный пример 4. Анализ эффективности *in vivo* в соответствии с пероральным введением соединений в мышинной модели воспалительного заболевания кишечника, индуцированного декстрансульфатом натрия (DSS).

Способ анализа.

Мышей C57BL/6 в возрасте 7-8 недель приобретали у OrientBio (Korea), стабилизировали обычным твердым кормом в течение 7 дней, а затем использовали в настоящем эксперименте. Корм и вода были в свободном доступе в течение периода эксперимента, а температуру в помещении для разведения поддерживали при $25\pm 1^\circ\text{C}$, и относительную влажность при $50\pm 10\%$. Управление освещением контролировали в 12-часовом цикле свет-темнота с помощью автоматического контроллера освещения.

(1) Индуцирование острого хронического энтерита с помощью DSS и измерение профилактического и терапевтического эффектов лекарственных средств.

Энтерит индуцировали у мышей, давая им свободно пить питьевую воду, содержащую 2% соли DSS (M.W. 36,000~50,000, MP Biomedicals, LLC, OH, USA). Для модели хронического энтерита DSS вводили с использованием графика введения DSS в течение первых 7 дней, введения обычной питьевой воды в течение 14 дней, повторного введения DSS в течение 7 дней с 21-го дня и введения обычной питьевой воды в течение 7 дней. Лекарственное средство вводили 1 раз в сутки 6 дней в неделю с первого дня введения DSS (фиг. 2A). Экспериментальные группы разделяли на 6 групп (контрольная группа, группа, получавшая только DSS, группа, получавшая DSS+сульфасалазин (300 мг/кг), группа, получавшая DSS+тофацитиниб (30 мг/кг), группа, получавшая DSS+испытуемое лекарственное средство (1 мг/кг)), по 6 животных в каждой группе и средней массой тела 20 ± 1 г в соответствии со схемой рандомизированных блоков. Для измерения дозозависимого терапевтического эффекта лекарственного средства на модели острого энтерита DSS вводили в течение 5 дней для индуцирования энтерита, а затем лекарственное средство вводили в течение 14 дней для измерения степени исцеления и лечения энтерита (фиг. 3A). Препарат вводили перорально 1 раз в сутки в течение 10 дней в фиксированное время.

(2) Наблюдение за массой.

Изменения массы тела каждой мыши наблюдали во время DSS и введения лекарственного средства с помощью цифрового измерителя массы.

(3) Измерение длины и массы толстой кишки.

Извлекали толстую кишку мыши и измеряли длину и массу от ануса до слепой кишки.

(4) Измерение MPO.

Степень нейтрофильной инфильтрации в ткани измеряли по количеству MPO, фермента-маркера нейтрофилов. Ткань толстой кишки размером 1 см промывали холодным PBS и взвешивали, добавляли лизирующий буфер (pH 7,4, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM tris, 10% глицерин, 1 mM PMSF, 1 мкг/мл лейпептина и 28 мкг/мл апротинина) (500 мкл на 10 мг массы ткани), и затем гомогенизировали с помощью гомогенизатора Bead Blaster® D2400 (Benchmark Scientific, NJ, USA). Гомогенизированный образец дважды центрифугировали при $1500\times g$ в течение 5 минут для получения супернатанта, а затем определяли 100 мкл этого супернатанта с помощью набора. Гомогенизированный образец дважды центрифугировали при $1500\times g$ в течение 5 минут для получения супернатанта, а затем определяли 100 мкл этого супернатанта с помощью набора MPO ELISA (HK210, Nycult Biotechnology, Netherlands). Супернатант добавляли в 96-луночный планшет (100 мкл/лунку), покрытый анти-мышинный MPO антителом, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, затем промывали 3 раза промывочным буфером. В планшет добавляли восстановленный индикатор (100 мкл/лунка), который вступал в реакцию при комнатной температуре в течение 1 ч, промывали 3 раза, и затем в каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл конъюгата стрептавидин-пероксидаза. Планшет подвергали реакции при комнатной температуре в течение 1 ч, промывали и добавляли по 100 мкл раствора субстрата TMB в каждую лунку планшета, затем подвергали реакции в течение 30 минут. Реакцию останавливали, добавляя в каждую лунку планшета по 100 мкл стоп-раствора, и измеряли оптическую плотность при 450 нм. Активность MPO означает количество 1 мкМ пероксида водорода, восстановленного из воды при 25°C в течение 1 мин. Это считывали как количество MPO, содержащееся в 1 мл гомогената ткани толстой кишки.

(5) Окрашивание тканей.

Окрашивание ткани проводили так же, как в случае окрашивания гематоксилином/эозином ткани толстой кишки крысы, и таким же образом применяли балльные индексы повреждения и восстановления слизистой оболочки.

Анализ эффекта перорального введения соединений на DSS-индуцированный острый и хронический энтерит мыши.

Измеряли ингибирующую активность соединения X-24 в отношении DSS-индуцированного хронического энтерита мышей, и результаты представлены в табл. 8. Измеряли дозозависимую терапевтическую эффективность соединения X-09 при DSS-индуцированном остром энтерите мыши, и результаты представлены в табл. 9.

Таблица 8

Соединение	Доза	Хронический энтерит (введение DSS-вода-DSS/всего 35 дней)	
		Степень восстановления массы кишечника (%)	Степень восстановления массы тела (%)
Сульфасалазин	300 мг/кг	66,9	22,8
Тофацитиниб	30 мг/кг	68,2	29,5
X-24	1 мг/кг	58,1	22,8
X-24	3 мг/кг	98,2	73,3

Таблица 9

Соединение	Доза	Острый энтерит	
		Степень восстановления массы кишечника (%)	Степень восстановления массы тела (%)
Сульфасалазин	300 мг/кг	66,2	65,9
Тофацитиниб	30 мг/кг	80,9	80,8
X-09	0,3 мг/кг	48,4	56,5
X-09	1 мг/кг	76,7	72,0
X-09	3 мг/кг	89,0	80,7
X-09	10 мг/кг	96,4	88,1

1. Изменение массы.

В модели хронического энтерита, при которой хроническое воспаление индуцировали путем подачи воды, содержащей 2% DSS, в течение 7 дней, воды в течение 14 дней, а затем воды, содержащей 2% DSS, в течение 7 дней у мышей массой 19-21 г, измеряли эффективность пиридинолового соединения. Изменения массы тела наблюдали на модели хронического энтерита. В результате масса мыши контрольной группы, получавшей носитель, продолжала увеличиваться, и масса мыши группы, получавшей DSS, снижалась из-за обработки DSS и масса начинала восстанавливаться во время употребления воды, но масса значительно уменьшилась вследствие второго введения DSS. Степень восстановления массы у мышей из группы, получавшей 300 мг/кг сульфасалазина или 30 мг/кг тофацитиниба, группы положительного контроля, через 35 дней составила 22,8% и 29,4% соответственно по сравнению с контрольной группой мышей, получавшей носитель. С другой стороны, мыши из группы, получавшей соединение пиридинола X-24, показали дозозависимую степень восстановления массы тела (22,8%, 73,3%) (фиг. 2B).

В модели острого энтерита, при которой воспаление кишечника индуцировали введением воды, содержащей 2% DSS, в течение 7 дней у мышей массой 19-21 г, изменение массы тела наблюдали в определенное время каждый день в зависимости от массы тела до введения DSS. В результате масса тела мышей контрольной группы, получавших носитель, продолжала увеличиваться, а масса мышей группы, получавших DSS, продолжала снижаться, и, таким образом, масса тела была значительно снижена по сравнению с мышами нормальной группы. Масса тела мышей, получавших 300 мг/кг сульфасалазина или 30 мг/кг тофацитиниба, группа положительного контроля, постепенно восстанавливалась, и хотя масса тела была снижена по сравнению с массой тела крыс контрольной группы, получавших носитель, она была значительно увеличена по сравнению с массой тела мышей, получавших только DSS, в результате чего степень восстановления массы тела составила 65,9% и 80,9% соответственно. Изменяли дозозависимую эффективность соединения X-09 в отношении DSS-индуцированного острого воспаления кишечника при пероральном введении. В результате у мышей группы, получавшей пиридиноловое соединение X-09, степень восстановления массы тела составила 56,5, 72,0, 80,7 и 88,1% при концентрациях соединения 0,3, 1, 3 и 10 мг/кг соответственно (фиг. 3B).

2. Морфологическое исследование.

Через 7 дней введения лекарственного средства толстую кишку извлекали и визуально осматривали. В результате толстая кишка мышей, получавших DSS, была значительно короче по сравнению с контрольной группой, и наблюдали отек и гиперемиию. Кроме того, наблюдали отек и закупорку червеобразного отростка и спайки тканей кишечника. В группе, получавшей 300 мг/кг сульфасалазина или 30 мг/кг

тофацитиниба, группе положительного контроля, наблюдали восстановление длины кишечника, а также значительно подавлялись макроскопические симптомы и спайки между другими органами и застойные явления в толстой кишке. В группе, получавшей пиридиноловое соединение, наблюдали более выраженное улучшение симптомов, чем в группе, получавшей 30 мг/кг тофацитиниба, а также в группе, получавшей 300 мг/кг сульфасалазина (фиг. 2С). Соединение X-09 показало дозозависимую терапевтическую эффективность, и терапевтический эффект в группе, получавшей 10 мг/кг соединения X-09, был значительно выше, чем в контрольной группе, получавшей 30 мг/кг тофацитиниба (фиг. 3С).

3. Измерение массы толстой кишки.

Извлекали толстую кишку мыши и измеряли массу ткани между анусом и слепой кишкой. В результате, масса толстой кишки с отеком была значительно увеличена у мышей из группы, получавшей только DSS, по сравнению с мышами контрольной группы, получавшей носитель. В случае модели хронического энтерита степень восстановления массы кишечной ткани у мышей, получавших 300 мг/кг сульфасалазина или 30 мг/кг тофацитиниба, положительный контроль, составила 67,3% и 68,8% соответственно. Соединение X-24 показало дозозависимую степень восстановления (58,1% и 98,2%) при 1 мг/кг и 3 мг/кг (фиг. 2D).

Терапевтическую эффективность соединений измеряли на модели острого энтерита. В результате восстановление массы кишечной ткани наблюдали в группе, получавшей 300 мг/кг сульфасалазина или 30 мг/кг тофацитиниба, положительный контроль. Соединение X-09 продемонстрировало дозозависимый эффект и показало лучший эффект, чем группа положительного контроля, при дозах 3 мг/кг и 10 мг/кг (фиг. 3D). Кроме того, измеряли уровень МРО, биохимический показатель воспаления тканей. В результате уровень МРО, значительно повышенный под действием DSS, снижался под действием соединения X-09 в зависимости от дозы, а группы, получавшие соединение X-09 в концентрациях 3 мг/кг и 10 мг/кг, показали превосходный эффект, чем группа положительного контроля (фиг. 3E).

4. Измерение восстановления повреждения слизистой оболочки толстой кишки мыши.

После наблюдения морфологии толстой кишки в эксперименте по измерению дозозависимой активности проводили окрашивание ткани толстой кишки гематоксилин-эозином для оценки и сравнения степени повреждения слизистой оболочки толстой кишки. В результате соединение X-09 продемонстрировало дозозависимый эффект восстановления повреждения слизистой оболочки, и было подтверждено, что эффект превосходил контрольную группу, тофацитиниб (фиг. 4).

Из результатов экспериментального примера 4 было подтверждено, что соединение, представленное формулой 1, по настоящему изобретению можно эффективно использовать для лечения воспалительного заболевания кишечника, и можно видеть, что соединение по настоящему изобретению можно использовать в качестве заменителя существующих лекарственных средств.

Экспериментальный пример 5. Анализ эффективности *in vivo* при пероральном введении соединений на животной модели индуцированного коллагеном ревматоидного артрита.

Способ анализа.

Здоровых самцов мышей в возрасте 12 недель и мышей DBA/1J с индуцированным артритом приобретали в Central Lab. Animal Inc. (Чтобы вызвать артрит, мышей DBA/1J сенсibilизировали путем инъекции смешанного раствора полного адьюванта Фрейнда (CFA; DIFCO, Detroit, MI) и бычьего коллагена II типа (1:1, об./об.) внутрикожно в основание ушной раковины в возрасте 8 недель, и затем проводили вторичную сенсibilизацию внутрикожной инъекцией в корень основания хвоста в возрасте 11 недель). Приобретенных мышей с артритом акклиматизировали в лабораторных условиях в течение недели, после чего начинали пероральное введение препарата.

(1) Визуальное наблюдение и измерение артрита.

Визуальное наблюдение за артритическими поражениями проводили с использованием следующих баллов на основе эталона (Barnett et al., 1998).

0: нет отека или опухания,

1: небольшой отек и покраснение, локализованные на стопе или голеностопном суставе,

2: небольшой отек и покраснение от голеностопного сустава до кости предплюсны,

3: умеренный отек и покраснение от голеностопного сустава до кости предплюсны,

4: отек, покраснение и тугоподвижность суставов от лодыжки до всей ноги.

Таким образом, самый высокий балл артритических поражений составил 16 на мышшь. Наблюдения проводили два раза в неделю в течение 5 недель со дня введения препарата, и данные оценки подготавливали два человека, не знавшие экспериментальную группу и контрольную группу.

Кроме того, были сделаны фотографии для визуального определения степени артрита.

(2) Измерение толщины задней лапы.

Толщину задней лапы, которая является одним из патологических показателей ревматоидного артрита, измеряли штангенциркулем.

(3) Окрашивание суставной ткани.

У каждой мыши удаляли правую заднюю лапу и удаляли всю кожу и мышцы, оставляя только кости и суставы. Заднюю ногу фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 2 дней, затем погружали в 10% муравьиную кислоту на 5 дней для декальцификации, а затем погружали в 30% раствор

сахарозы. Когда ткани оседали, суставную ткань нарезали толщиной 30 мкм с использованием криомикротомы (Microm HM 450, Thermo Fisher Scientific, Germany) и хранили в растворе для криоконсервации. Окрашивание проводили с использованием сохраненных срезов тканей. После прикрепления срезов тканей к предметному стеклу их гидратировали 100%, 95%, 70% и 50% растворами этанола, и некоторые окрашивали сафранином, а другие окрашивали гематоксилином/эозином. Для окрашивания сафранином срезы тканей сначала окрашивали 0,1% раствором стойкого зеленого, промывали 1% раствором уксусной кислоты, и затем окрашивали 1% раствором сафранина. После этого срезы тканей обезвоживали путем погружения в растворы этанола в порядке, обратном гидратации, а затем консервировали в растворе ксилола и заливочной среде и фотографировали под микроскопом. Окрашивание гематоксилином/эозином проводили так же, как и при окрашивании ткани толстой кишки. Срезы тканей обезвоживали, консервировали в растворе ксилола и заливочной среде, и исследовали под микроскопом.

Степень микроскопического повреждения ткани окрашенной суставной ткани измеряли с использованием следующих баллов.

Степень 1: отсутствие повреждений суставной поверхности.

Степень 2: прерывистая суставная поверхность.

Степень 3: вертикальные трещины в суставе.

Степень 4: коррозия в суставе.

Степень 5: оголение суставной эрозии.

Степень 6: суставная деформация.

(4) Выделение и стимуляция лимфоцитов.

После извлечения селезенки и дренирующих лимфатических узлов мышей подсчитывали количество иммунных клеток. Для подтверждения распределение клеток Th1 и Th17, иммунные клетки, полученные из каждого органа, стимулировали с использованием РМА/иономицина и остановки Гольджи.

После окрашивания с использованием анти-IFN- γ -антитела, которое может идентифицировать клетки Th1, анти-IL-17-антитела, которое может идентифицировать клетки Th17, и анти-CD8-антитела, которое может идентифицировать цитотоксические Т-клетки, доля воспалительных клеток среди общего количества иммунных клеток была подтверждена с помощью проточной цитометрии.

Barnett ML, Kremer JM, St Clair EW, Clegg DO, Furst D, Weisman M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with oral type II collagen. Results of a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 1998; 41:290-7.

Анализ эффекта перорального введения соединения X-09 на животной модели индуцированного коллагеном ревматоидного артрита (CIA).

Оценки визуального наблюдения и изменения массы в зависимости от степени артрита показаны на фиг. 5. Артрит-индуцированные мыши, демонстрировали средний балл артрита 12,8 на почти таком же уровне до 4-го дня введения лекарственного средства. Мыши в группе, получавшей носитель, сохраняли степень артрита без улучшения и демонстрировали индекс артрита 13,8 балла на 35-й день. Однако при введении тофацитиниба или соединения X-09 степень артрита значительно улучшалась в зависимости от дозы. На 35-й день введения препарата группа, получавшая 50 мг/кг соединения X-09, показала наилучшую эффективность с показателем артрита 7,2, за ней следовала группа, получавшая 50 мг/кг тофацитиниба, группа, получавшая 10 мг/кг соединения X-09 и группа, получавшая 1 мг/кг соединения X-09 (фиг. 5A). Толщина задней лапы мышей с артритом составляла от 2,58 до 2,61 мм на четвертый день введения лекарственного средства, что значительно увеличивалось по сравнению со средней толщиной задней лапы здоровых мышей, равной 1,64 мм. На 35-й день введения лекарственного средства толщина задней лапы, увеличенная за счет воспалительного отека, сохранялась на уровне 2,65 мм и значительно уменьшалась до 1,70 мм в группе, получавшей 50 мг/кг соединения X-09, и толщина задней лапы уменьшалась в порядке группы, получавшей 50 мг/кг тофацитиниба, группы, получавшей 10 мг/кг соединения X-09, и группы, получавшей 1 мг/кг соединения X-09 (фиг. 5B). Масса тела мышей с артритом была значительно снижена по сравнению с массой тела здоровых мышей того же возраста, и масса тела постепенно восстанавливалась пропорционально степени улучшения артрита (фиг. 5C).

Еженедельные изменения степени артрита задних лап отображали в виде фотоизображений (фиг. 6). Суставную ткань окрашивали гематоксилином и эозином и сафранином O, степень восстановления суставной ткани переводили в балл (фиг. 7).

Через 35 дней после введения препарата из селезенки и дренирующих лимфатических узлов выделяли иммунные клетки и анализировали. В результате было подтверждено, что общее количество иммунных клеток в селезенке существенно не отличалось от такового в нормальной группе (фиг. 8A), но количество воспалительных клеток Th1 и Th17 и количество активированных клеток CD8 были значительно снижены. Из приведенных выше результатов было подтверждено, что дозозависимое снижение под действием соединения X-09 (фиг. 8B). Количество воспалительных клеток Th1 и Th17 и количество активированных клеток CD8, секретирующих гамма-интерферон, также было значительно снижено в дренирующем лимфатическом узле (фиг. 8C), и соединение X-09 показывало дозозависимый эффект.

Из приведенных выше результатов было подтверждено, что соединение, представленное формулой 1, по настоящему изобретению может быть эффективно использовано для лечения ревматоидного артрита.

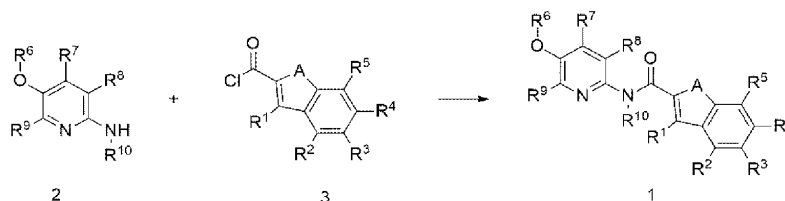
Следовательно, соединения по настоящему изобретению могут быть эффективно использованы в качестве фармацевтической композиции для профилактики и лечения аутоиммунных заболеваний, в частности, воспалительного воспаления кишечника или ревматоидного артрита, что подтверждено в приведенных выше экспериментах.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение выбирают из 5-бром-N-(5-гидрокси-3,4,6-триметилпиридин-2-ил)-1Н-индол-2-карбоксамид; N-(5-гидрокси-3,4,6-триметилпиридин-2-ил)-5-метил-1Н-индол-2-карбоксамид; 3-хлор-6-фтор-N-(5-гидрокси-3,4,6-триметилпиридин-2-ил)бензо[б]тиофен-2-карбоксамид; 3-хлор-6-фтор-N-(3,4,6-триметил-5-(2-оксо-2-(фениламино)этокси)пиридин-2-ил)бензо[б]тиофен-2-карбоксамид.

2. Способ получения соединения по п.1, представленного формулой 1, включающий взаимодействие соединения, представленного формулой 2, с соединением, представленным формулой 3:

Схема реакции 1



где в схеме реакции 1

A, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹ и R¹⁰ выбраны из комбинации 1)-4):

1) A представляет собой NH;

R¹, R², R⁴, R⁵, R⁶ и R¹⁰ представляют собой H;

R³ представляет собой Br; и

R⁷, R⁸ и R⁹ представляют собой CH₃;

2) A представляет собой NH;

R¹, R², R⁴, R⁵, R⁶ и R¹⁰ представляют собой H;

R³ представляет собой CH₃; и

R⁷, R⁸ и R⁹ представляют собой CH₃;

3) A представляет собой S;

R¹ представляет собой Cl;

R², R³, R⁵, R⁶ и R¹⁰ представляют собой H;

R⁴ представляет собой F; и

R⁷, R⁸ и R⁹ представляют собой CH₃; и

4) A представляет собой S;

R¹ представляет собой Cl;

R², R³, R⁵ и R¹⁰ представляют собой H;

R⁴ представляет собой F;

R⁶ представляет собой -CH₂-C(O)-NH-фенил; и

R⁷, R⁸ и R⁹ представляют собой CH₃.

3. Способ получения 3-хлор-6-фтор-N-(3,4,6-триметил-5-(2-оксо-2-(фениламино)этокси)пиридин-2-ил)бензо[б]тиофен-2-карбоксамид по п.1, представленного формулой 1, где

A представляет собой S;

R¹ представляет собой Cl;

R², R³ и R⁵ представляют собой H;

R⁴ представляет собой F;

R⁶ представляет собой -CH₂-C(O)-NH-фенил;

R⁷, R⁸ и R⁹ представляют собой CH₃;

R¹⁰ представляет собой H;

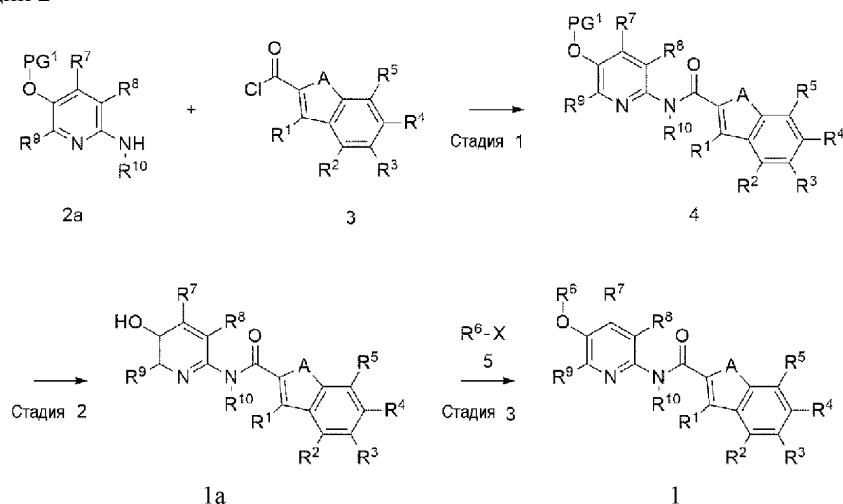
включающий следующие стадии:

получение соединения, представленного формулой 4, путем взаимодействия соединения, представленного формулой 2а, с соединением, представленным формулой 3 (стадия 1);

получение соединения, представленного формулой 1а, путем удаления защитной группы у соединения, представленного формулой 4, полученного на стадии 1 (стадия 2); и

получение соединения, представленного формулой 1, путем взаимодействия соединения, представленного формулой 1а, полученного на стадии 2, с соединением, представленным формулой 5 (стадия 3):

Схема реакции 2



где в схеме реакции 2

PG¹ представляет собой защитную группу для спирта, выбранную из группы, состоящей из ацетила (Ac), бензоила (Bz), бензила (Bn), метилтиометилового эфира, MEM (β -метоксиэтоксиметилового эфира), DMT (диметокситритил, [бис-(4-метоксифенил)фенилметил]), MOM (метоксиметилэфир), MMT (метокситритил [(4-метоксифенил)дифенилметил]), PMP (п-метоксибензиловый эфир), Piv (пивалоил), THP (тетрагидропиридил), THF (тетрагидрофуран) и тритил (трифенилметил, Tr); и

X представляет собой галоген.

4. Способ профилактики или лечения аутоиммунного заболевания, включающий введение соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли субъекту, нуждающемуся в этом, где аутоиммунное заболевание представляет собой ревматоидный артрит или воспалительное заболевание кишечника.

5. Способ по п.4, где соединение ингибирует адгезию моноцитов к эпителиальным клеткам кишечника посредством TNF- α или IL-6.

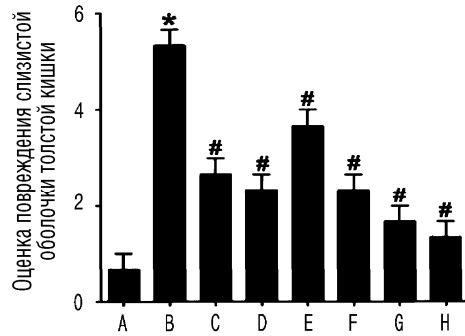
6. Способ по п.4, где воспалительное заболевание кишечника представляет собой по меньшей мере одно, выбранное из группы, состоящей из энтерита, колита, язвенного энтерита, болезни Крона, цитомы Крона, синдрома раздраженного кишечника, геморрагической язвы прямой кишки, паучита, пептической язвы, кишечной болезни Бехчета и гастрита.

7. Применение соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для профилактики или лечения аутоиммунного заболевания, где аутоиммунное заболевание представляет собой ревматоидный артрит или воспалительное заболевание кишечника.

8. Применение по п.7, где соединение ингибирует адгезию моноцитов к эпителиальным клеткам кишечника посредством TNF- α или IL-6.

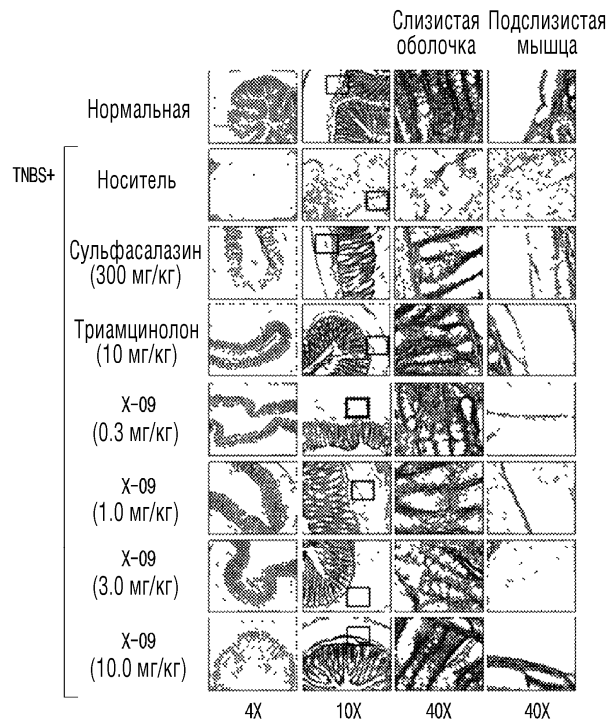
9. Применение по п.7, где воспалительное заболевание кишечника представляет собой по меньшей мере одно, выбранное из группы, состоящей из энтерита, колита, язвенного энтерита, болезни Крона, цитомы Крона, синдрома раздраженного кишечника, геморрагической язвы прямой кишки, паучита, пептической язвы, кишечной болезни Бехчета и гастрита.

- A. Нормальная
- B. TNBS + Носитель
- C. TNBS + Сульфасалазин (300 мг/кг)
- D. TNBS + Триамцинолон (10 мг/кг)
- E. TNBS + X-09 (0.3 мг/кг)
- F. TNBS + X-09 (1 мг/кг)
- G. TNBS + X-09 (3 мг/кг)
- H. TNBS + X-09 (10 мг/кг)



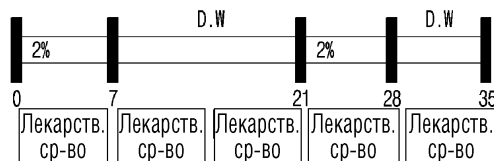
* $P < 0.05$ vs TNBS необработанный контроль
 # $P < 0.05$ vs TNBS + группа, обработанная носителем

Фиг. 1А

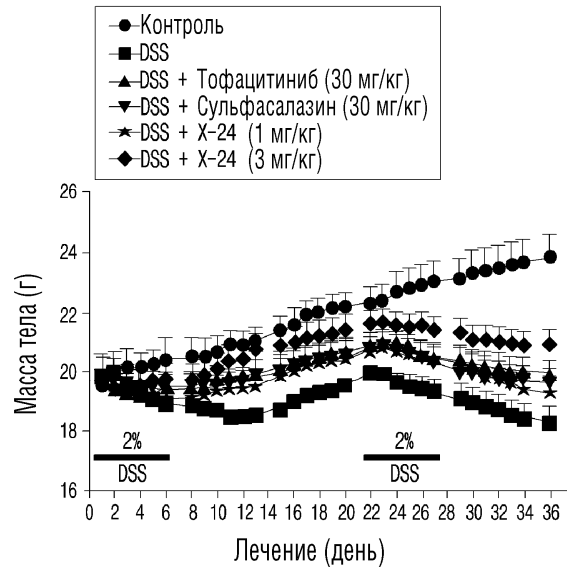


Фиг. 1В

Модель хронического колита

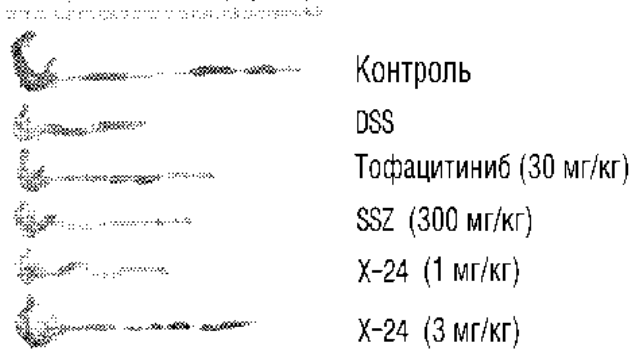


Фиг. 2А

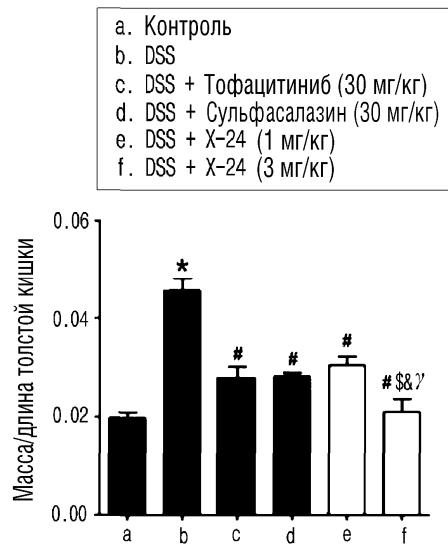


Фиг. 2B

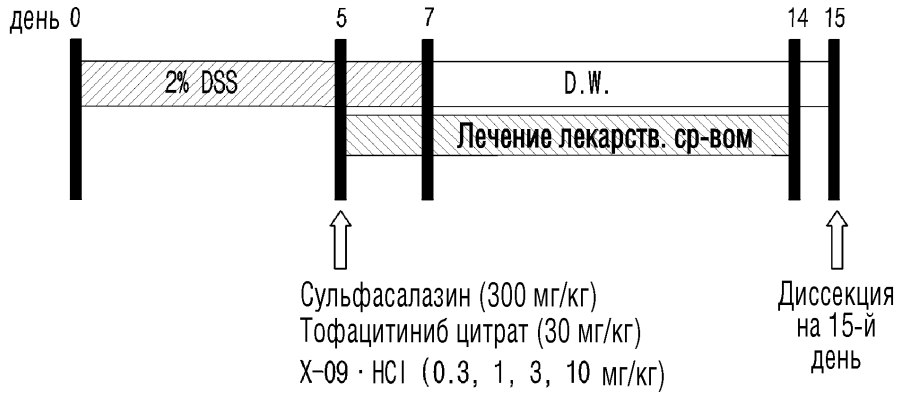
6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



Фиг. 2C

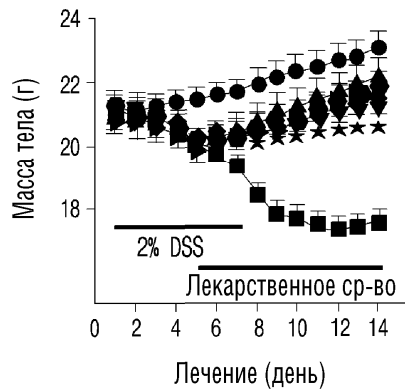


Фиг. 2D



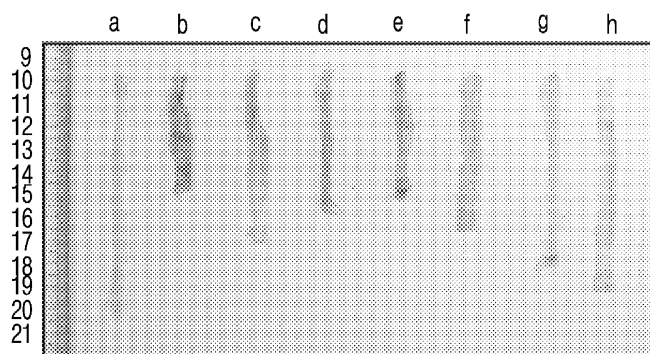
Фиг. 3А

- Нормальная
- DSS + Носитель
- ▲ DSS + Тофацитиниб цитрат (30 мг/кг)
- ▼ DSS + Сульфасалазин (300 мг/кг)
- ★ DSS + X-09 · HCl (0.3 мг/кг)
- ◆ DSS + X-09 · HCl (1 мг/кг)
- ▶ DSS + X-09 · HCl (3 мг/кг)
- DSS + X-09 · HCl (10 мг/кг)



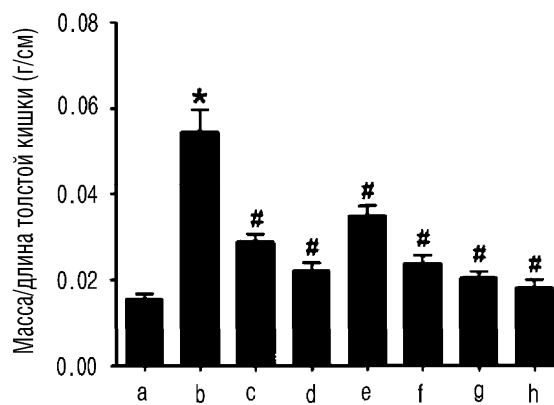
Фиг. 3В

- а. Контроль
 б. DSS + Носитель
 в. DSS + Сульфасалазин (300 мг/кг)
 д. DSS + Тофацитиниб (30 мг/кг)
 е. DSS + X-09 · HCl (0.3 мг/кг)
 ф. DSS + X-09 · HCl (1 мг/кг)
 г. DSS + X-09 · HCl (3 мг/кг)
 h. DSS + X-09 · HCl (10 мг/кг)



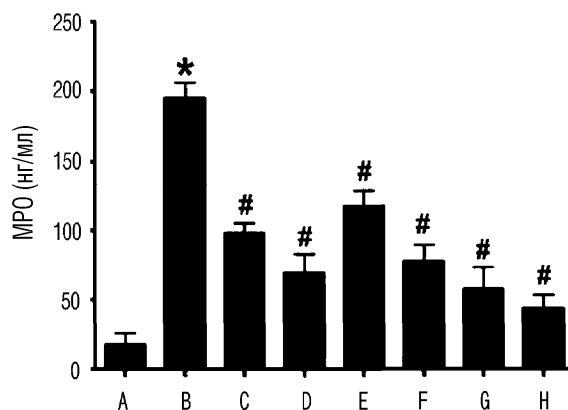
Фиг. 3С

- а. Контроль
 б. DSS + Носитель
 в. DSS + Сульфасалазин (300 мг/кг)
 д. DSS + Тофацитиниб (30 мг/кг)
 е. DSS + X-09 · HCl (0.3 мг/кг)
 ф. DSS + X-09 · HCl (1 мг/кг)
 г. DSS + X-09 · HCl (3 мг/кг)
 h. DSS + X-09 · HCl (10 мг/кг)



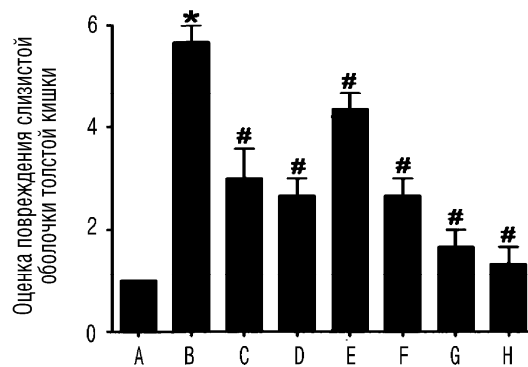
Фиг. 3D

- А. Нормальная
 В. DSS + Носитель
 С. DSS + Сульфасалазин (300 мг/кг)
 D. DSS + Тофацитиниб (30 мг/кг)
 E. DSS + X-09 · HCl (0.3 мг/кг)
 F. DSS + X-09 · HCl (1 мг/кг)
 G. DSS + X-09 · HCl (3 мг/кг)
 H. DSS + X-09 · HCl (10 мг/кг)



Фиг. 3Е

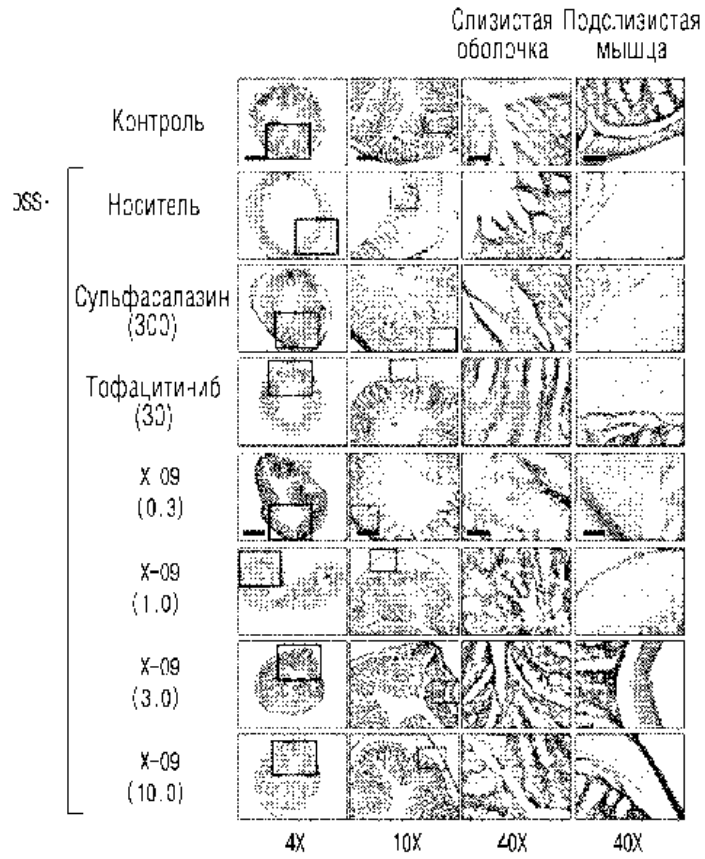
- А. Контроль
 В. DSS + Носитель
 С. DSS + Сульфасалазин (300 мг/кг)
 D. DSS + Тофацитиниб (30 мг/кг)
 E. DSS + X-09 (0.3 мг/кг)
 F. DSS + X-09 (1 мг/кг)
 G. DSS + X-09 (3 мг/кг)
 H. DSS + X-09 (10 мг/кг)



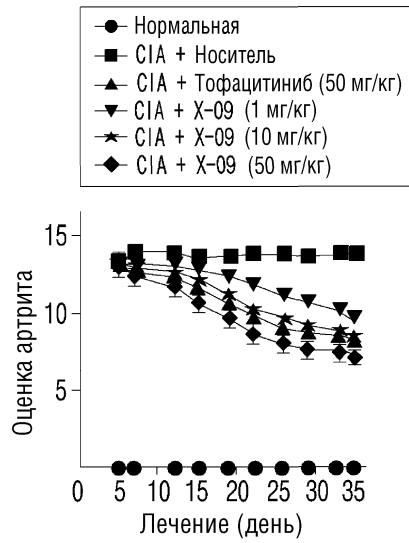
* $P < 0.05$ vs DSS необработанный контроль

$P < 0.05$ vs DSS + группа, обработанная носителем

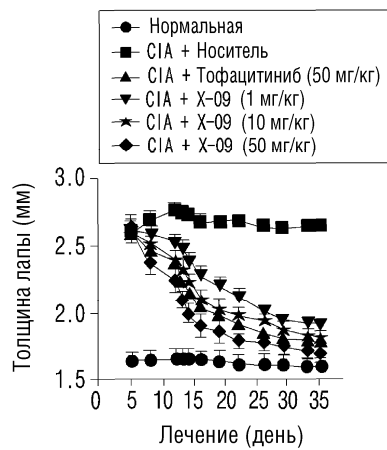
Фиг. 4А



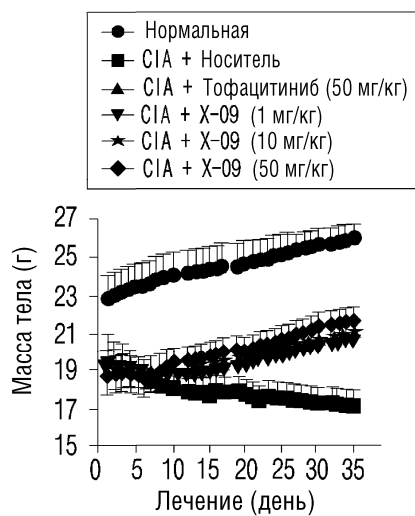
Фиг. 4В



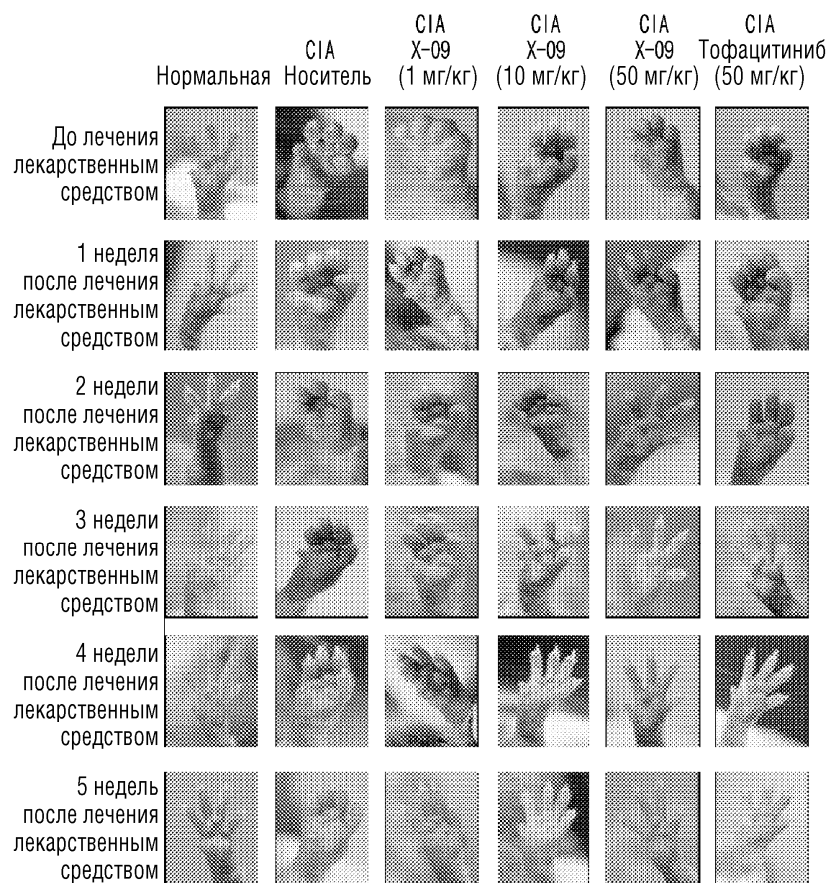
Фиг. 5А



Фиг. 5В



Фиг. 5С

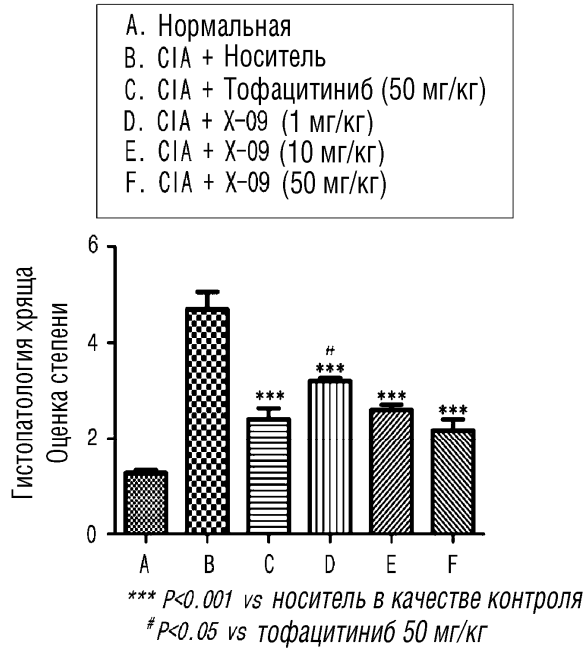


Фиг. 6

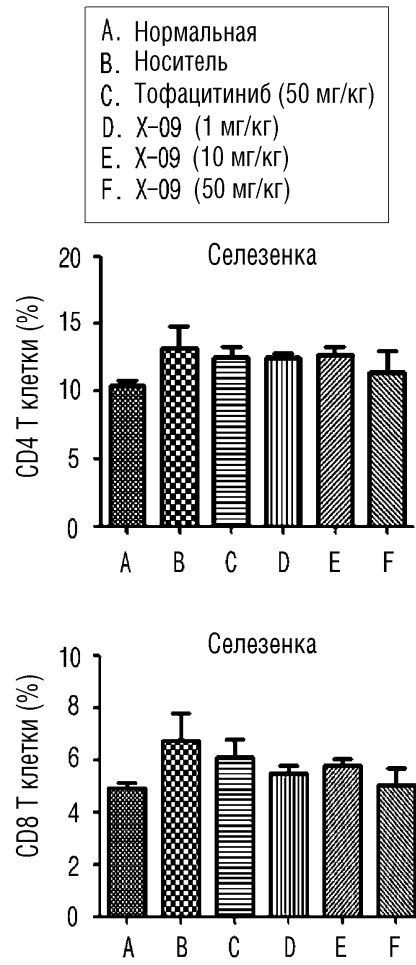
Окрашивание ткани коленного сустава



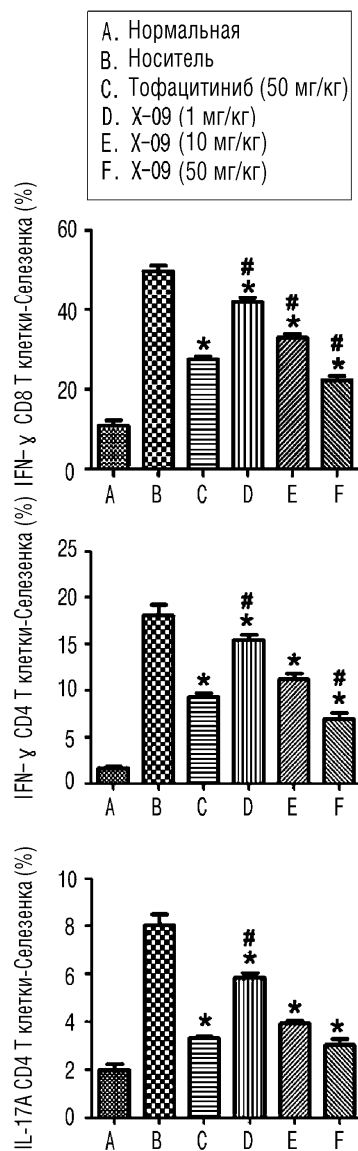
Фиг. 7А



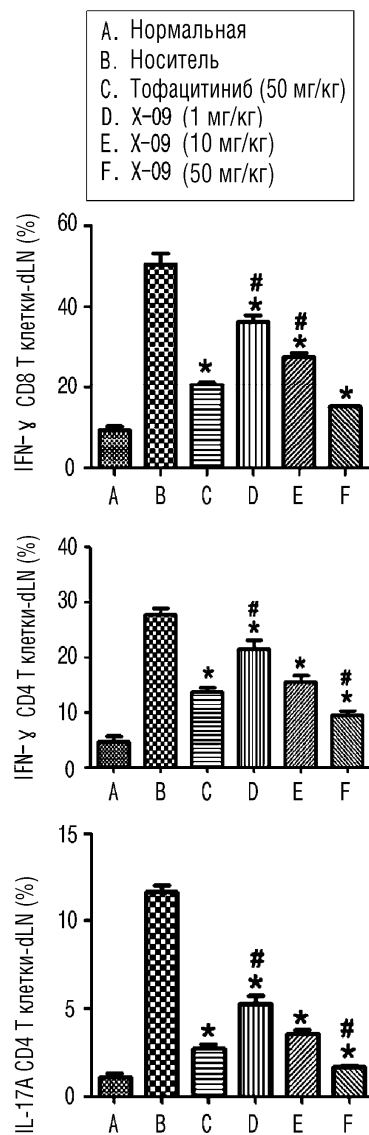
Фиг. 7В



Фиг. 8А



Фиг. 8В



Фиг. 8С



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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