



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 118751

(13) C2

(51) МПК

C07D 239/48 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

| | | | |
|--|--|---|--|
| (21) Номер заявки: | а 2015 08985 | (72) Винахідник(и): | Мак Гоуен Девід Крейг (BE), Рабуассон П'єр Жан-Марі Бернар (BE), Йонкерс Тім Х'юго Марія (BE) |
| (22) Дата подання заявки: | 20.02.2014 | (73) Власник(и): | ЯНССЕН САЙЄНСІЗ АЙРЛЕНД ЮСІ, Eastgate Village, Eastgate, Little Island, Co Cork, Ireland (IE) |
| (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: | 11.03.2019 | (74) Представник: | Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115 |
| (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: | 13156167.2 | (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: | WO 2012/136834 A1, 11.10.2012 WO 2010/133885 A1, 25.11.2010 |
| (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: | 21.02.2013 | | |
| (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: | EP | | |
| (41) Публікація відомостей про заявку: | 10.11.2015, Бюл.№ 21 | | |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: | 11.03.2019, Бюл.№ 5 | | |
| (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ | РСТ/EP2014/053273, 20.02.2014 | | |

(54) ПОХІДНІ 2-АМІНОПІРИМІДИНУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ**(57) Реферат:**

Даний винахід стосується похідних 2-амінопіримідину, способів їх одержання, фармацевтичних композицій та їх застосування в лікуванні вірусних інфекцій.

UA 118751 C2

Даний винахід стосується похідних 2-амінопіримідину, способів їх одержання, фармацевтичних композицій та їх застосування в лікуванні вірусних інфекцій.

Даний винахід стосується застосування похідних 2-амінопіримідину в лікуванні вірусних інфекцій, імунних або запальних порушень, в які залучена модуляція або агонізм Toll-подібних рецепторів (TLR). Toll-подібні рецептори являють собою основні трансмембранні білки, що характеризуються позаклітинним лейцин-багатим доменом і цитоплазматичним розширенням, яке містить консервативну ділянку. Система вродженого імунітету може розпізнавати патоген-асоційовані молекулярні патерни за допомогою цих TLR, що експресуються на клітинній поверхні певних типів імунних клітин. Під час розпізнавання чужорідних патогенів активується вироблення цитокінів та підвищується експресія коstimулювальних молекул на фагоцитах. Це зумовлює модуляцію поведінки Т-клітин.

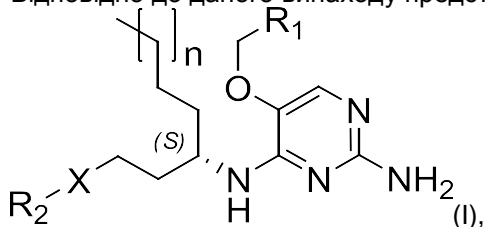
Встановлено, що більшість видів ссавців мають від десяти до п'ятнадцяти типів Toll-подібних рецепторів. Загалом у людей та мишей виявили тринадцять TLR (за назвами TLR1 - TLR13), а в інших видів ссавців виявили еквівалентні форми багатьох з них. Проте, еквіваленти визначених TLR, виявлених у людей, не є присутніми у всіх ссавців. Наприклад, ген, що кодує білок, аналогічний TLR10 у людей, є присутнім у мишей, але, очевидно, в певний момент у минулому він був пошкоджений ретровірусом. З іншого боку, в мишей експресуються TLR 11, 12 та 13, жоден з яких не представлений у людини. У інших ссавців можуть експресуватися TLR, які не було виявлено в людини. Інші види, відмінні від ссавців, можуть мати TLR, що відрізняються від таких у ссавців, і доказом цього є TLR14, виявлений у скелезуба роду *Takifugu*. Це може ускладнювати процедуру використання експериментальних тварин як моделей вродженого імунітету людини.

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

Раніше були описані сполуки, які виявляють активність стосовно Toll-подібних рецепторів, такі як похідні пурину у WO 2006/117670, похідні аденіну у WO 98/01448 та WO 99/28321 та піримідину у WO 2009/067081.

Разом з тим існує гостра потреба в нових модуляторах Toll-подібних рецепторів, які характеризуються переважною селективністю, вищою ефективністю, вищою метаболічною стабільністю, а також поліпшеним профілем безпеки порівняно зі сполуками з відомого рівня техніки.

Відповідно до даного винаходу представлена сполука формули (I),



або її фармацевтично прийнятна сіль, таутомер(таутомери), стереоізомерні форми, сольват або поліморф, де

X являє собою S, S=O або O=S=O,

R1 являє собою водень, (C1-6)-алкіл, (C1-6)-алкоксі або арил,

R2 являє собою (C1-3)-алкіл або (C3-6)-циклоалкіл,

а n = 1 або 2.

Сполуки формули (I) та їх фармацевтично прийнятні солі, таутомер(таутомери), стереоізомерні форми, сольват або поліморф мають активність як фармацевтичні препарати, зокрема, як модулятори Toll-подібних рецепторів (зокрема, активності TLR7 та/або TLR8).

У додатковому аспекті даний винахід пропонує фармацевтичну композицію, яка містить сполуку формули (I) або її фармацевтично прийнятну сіль, таутомер, стереоізомерну форму, сольват або поліморф разом з одним або декількома фармацевтично прийнятними наповнювачами, розріджувачами або носіями.

Крім того, сполуку формули (I) або її фармацевтично прийнятну сіль, сольват, таутомер, стереоізомерну форму або поліморф згідно з даним винаходом або фармацевтичну композицію, яка містить зазначену сполуку формули (I) або її фармацевтично прийнятну сіль, сольват, таутомер, стереоізомерну форму або поліморф, можна застосовувати як лікарський препарат.

Інший аспект даного винаходу полягає в тому, що сполуку формули (I) або її фармацевтично прийнятну сіль, її сольват, таутомер, стереоізомерну форму або поліморф або зазначену

фармацевтичну композицію, яка містить зазначену сполуку формули (I) або її фармацевтично прийнятну сіль, сольват, таутомер, стереоізомерну форму або поліморф, можна відповідно застосовувати в лікуванні порушення, в яке залучена модуляція TLR, конкретніше TLR7 та/або TLR8.

5 Термін "(С3-6)-алкіл" або "(С1-3)-алкіл" стосується нерозгалуженого, розгалуженого або циклічного насиченого аліфатичного вуглеводню, який містить певну кількість атомів вуглецю.

Термін "арил" стосується ароматичної кільцевої структури, яка необов'язково містить один або два гетероатоми, обрані з N, O та S, зокрема, з N та O. Зазначена ароматична кільцева структура може мати 4, 5, 6 або 7 атомів кільця. Зокрема, зазначена ароматична кільцева

10 структура може мати 5 або 6 атомів кільця.

Термін "(С1-6)-алкоксі" стосується алкільної (ланцюг з атомів вуглецю та водню) групи, зв'язаної одинарним зв'язком з атомом кисню, такої як метоксигрупа або етоксигрупа.

Термін "(С3-6)-циклоалкіл" стосується карбоциклічного кільця, яке містить певну кількість атомів вуглецю.

15 Як застосовується в даному документі, будь-яка хімічна формула зі зв'язками, наведеними тільки у вигляді суцільних ліній, а не у вигляді суцільних клиноподібних або пунктирних клиноподібних зв'язків, або іншим чином зазначена як та, що має конкретну конфігурацію (наприклад, R, S) навколо одного або декількох атомів, передбачає всі можливі стереоізомери або суміш двох або більше стереоізомерів.

20 Терміни "стереоізомери", "стереоізомерні форми" або "стереохімічно ізомерні форми" вище або нижче в даному документі застосовуються взаємозамінювано.

Даний винахід включає всі стереоізомери сполук за даним винаходом у формі чистого стереоізомеру або у формі суміші двох або більше стереоізомерів. Енантіомери є стереоізомерами, які являють собою дзеркальні зображення один одного, що не збігаються під час накладання. Суміш 1:1 пари енантіомерів являє собою рацемат або рацемічну суміш.

25 Діастереомери (або діастереоізомери) являють собою стереоізомери, які не є енантіомерами, тобто вони не співвідносяться як дзеркальні зображення. Якщо сполука містить подвійний зв'язок, замісники можуть перебувати в E- або Z- конфігурації. Якщо сполука містить щонайменше двозаміщену неароматичну циклічну групу, замісники можуть перебувати в цис- або транс-конфігурації.

Таким чином, даний винахід включає енантіомери, діастереомери, рацемати, E- ізомери, Z- ізомери, цис-ізомери, транс-ізомери та їх суміші у всіх випадках, коли це можливо з хімічної точки зору.

Значення всіх цих термінів, тобто енантіомери, діастереомери, рацемати, E- ізомери, Z- ізомери, цис-ізомери, транс-ізомери та їх суміші, відомі фахівцям в даній галузі.

35 Абсолютна конфігурація визначається згідно з системою Кана-Інгольда- Прелога. Конфігурація біля асиметричного атома визначається як R або як S. Виділені стереоізомери, абсолютна конфігурація яких невідома, можуть позначатися як (+) або (-) залежно від напрямку, в якому вони обертають плоскополяризоване світло. Наприклад, виділені енантіомери, абсолютна конфігурація яких невідома, можуть бути позначені як (+) або (-) залежно від напрямку, в якому вони обертають плоскополяризоване світло.

40 Якщо визначено конкретний стереоізомер, це означає, що зазначений стереоізомер практично не містить інших стереоізомерів, тобто зв'язаний з менше 50%, переважно з менше 20%, переважніше з менше 10%, ще переважніше з менше 5%, зокрема, з менше 2% та найпреважніше з менше 1% таких. Таким чином, якщо сполука формули (I) позначена, наприклад, як (R), це означає, що сполука практично не містить ізомер (S); якщо сполука формули (I) позначена, наприклад, як E, це означає, що сполука практично не містить Z- ізомер; якщо сполука формули (I) позначена, наприклад, як цис-, це означає, що сполука практично не містить транс-ізомер.

50 Фармацевтично прийнятні солі сполук формули (I) включають їх солі приєднання кислоти та основні солі. Придатні солі приєднання кислоти утворюються з кислот, які утворюють нетоксичні солі. Придатні основні солі утворюються з основ, які утворюють нетоксичні солі.

Сполуки за даним винаходом також можуть існувати в несольватованій та сольватованій формах. Термін "сольват" використовується в даному документі для опису молекулярного комплексу, який містить сполуку за даним винаходом та одну або декілька молекул фармацевтично прийнятного розчинника, наприклад, етанолу.

Термін "поліморф" стосується здатності сполуки за даним винаходом до існування в більше ніж одній формі або кристалічній структурі.

60 Сполуки за даним винаходом можна вводити у формі кристалічних або аморфних продуктів. Їх можна отримувати, наприклад, у формі твердої пресованої маси, порошків або плівок за

допомогою таких способів, як осадження, кристалізація, сублімаційне сушіння, сушіння розпилюванням або сушіння випарюванням. Їх можна вводити окремо або в комбінації з однією або декількома іншими сполуками за даним винаходом або в комбінації з однією або декількома іншими лікарськими засобами. Як правило, їх будуть вводити у формі складу в поєднанні з

одним або декількома фармацевтично прийнятними наповнювачами. Термін “наповнювач” використовується в даному документі для опису будь-якого інгредієнта, відмінного від сполуки(сполук) за даним винаходом. Вибір наповнювача здебільшого залежить від таких чинників, як конкретний спосіб введення, вплив наповнювача на розчинність і стабільність та природа лікарської форми.

Сполуки за даним винаходом або будь-яка їх підгрупа можуть бути складені в різні фармацевтичні форми з метою введення. Як придатні композиції можна згадати усі композиції, що зазвичай використовуються для системного введення лікарських засобів. Для одержання фармацевтичних композицій за даним винаходом ефективну кількість конкретної сполуки, необов'язково у формі солі приєднання, як активний інгредієнт об'єднують в однорідну суміш з фармацевтично прийнятним носієм, при цьому носій може мати широке розмаїття форм залежно від форми препарату, необхідного для введення. Ці фармацевтичні композиції переважно представлені в одиничній лікарській формі, придатній, наприклад, для перорального, ректального введення або введення через шкіру. Наприклад, для одержання композиції в пероральній лікарській формі можна використовувати будь-яке загальноприйняте фармацевтичне середовище, таке як, наприклад, вода, гліколи, олії, спирти тощо, у випадку пероральних рідких препаратів, таких як суспензії, сиропи, еліксири, емульсії та розчини; або тверді носії, такі як крохмалі, цукри, каолін, розріджувачі, змащувальні речовини, зв'язувальні речовини, розпушувачі тощо у випадку порошків, пігулок, капсул і таблеток. Завдяки простоті їх введення таблетки й капсули являють собою найпреважніші пероральні одиничні лікарські форми, у випадку яких, зрозуміло, застосовуються тверді фармацевтичні носії. Також включено препарати в твердій формі, які можуть бути перетворені безпосередньо перед застосуванням на препарати в рідкій формі. В композиціях, придатних для введення через шкіру, носій необов'язково включає засіб, що підвищує проникність, та/або придатний змочувальний засіб, необов'язково в комбінації з придатними добавками будь-якої природи в мінімальних частках, при цьому добавки не спричиняють значного шкідливого впливу на шкіру. Зазначені добавки можуть полегшувати введення в шкіру та/або можуть бути корисними для одержання необхідних композицій. Ці композиції можна вводити різними шляхами, наприклад, у формі трансдермального пластиру, шляхом точкового нанесення, у формі мазі. Сполуки згідно з даним винаходом можна також вводити шляхом інгаляції або інсуфляції за допомогою способів і складів, використовуваних у даній галузі для введення таким шляхом. Таким чином, у більшості випадків сполуки за даним винаходом можна вводити в легені у формі розчину, суспензії або сухого порошку.

Особливо переважним є складання зазначених вище фармацевтичних композицій в одиничну лікарську форму для простоти введення та рівномірності дозування. Одинична лікарська форма, застосовувана в даному документі, стосується фізично окремих одиниць, придатних як одиничні дози, при цьому кожна одиниця містить попередньо встановлену кількість активного інгредієнта, розраховану для одержання необхідного терапевтичного ефекту, в поєднанні з необхідним фармацевтичним носієм. Прикладами таких одиничних лікарських форм є таблетки (у тому числі подільні або вкриті оболонкою таблетки), капсули, пігулки, пакетики з порошком, пластинки, супозиторії, ін'єкційні розчини або суспензії тощо, а також їх окремі множини.

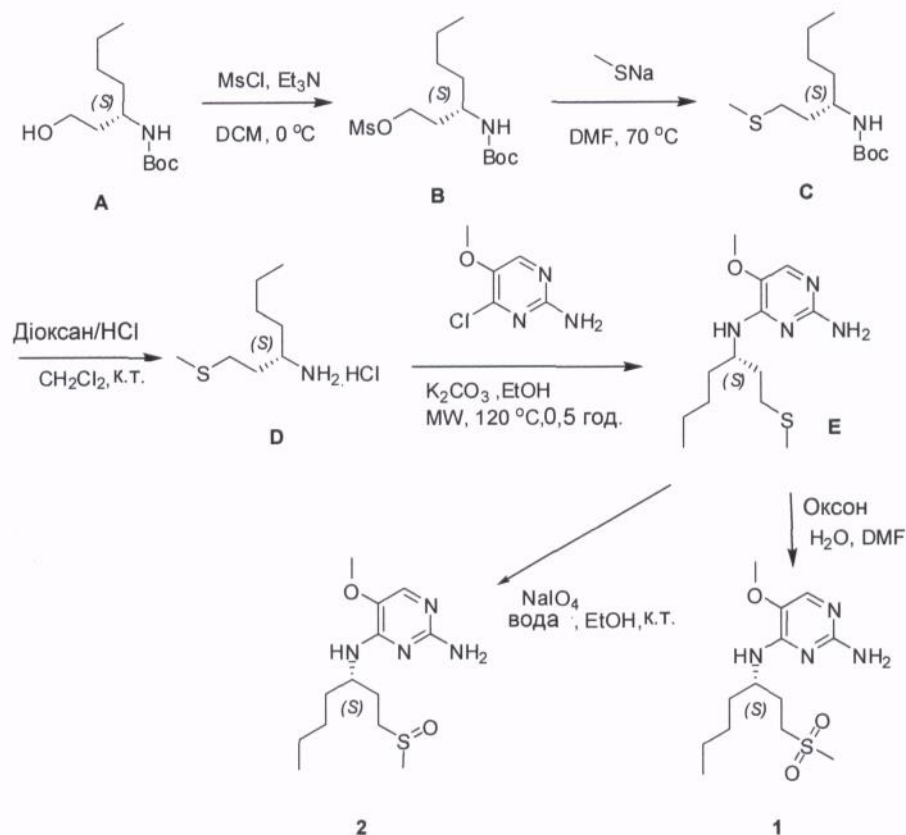
Фахівці в галузі лікування інфекційних захворювань зможуть визначити ефективну кількість, виходячи з результатів тестів, представлених далі в даному документі. Взагалі передбачається, що ефективна добова кількість може складати від 0,01 мг/кг до 50 мг/кг ваги тіла, переважніше від 0,1 мг/кг до 10 мг/кг ваги тіла. Може бути доцільним введення необхідної дози у формі двох, трьох, чотирьох або більше частин дози з відповідними інтервалами протягом доби. Зазначені частини дози можуть бути складені як одиничні лікарські форми, наприклад, які містять від 1 до 1000 мг і, зокрема, від 5 до 200 мг активного інгредієнта на одиничну лікарську форму.

Точне дозування та частота введення залежать від конкретної використовуваної сполуки формули (I), конкретного стану, що підлягає лікуванню, тяжкості стану, що підлягає лікуванню, віку, ваги та загального фізичного стану конкретного пацієнта, а також іншого медикаментозного лікування, яке може отримувати індивідум, що добре відомо фахівцям у даній галузі. Більше того, є очевидним, що ефективна кількість може бути зменшена або збільшена залежно від реакції суб'єкта, якого піддають лікуванню, та/або залежно від оцінки лікарем, який призначає сполуки за даним винаходом. Таким чином, згадані вище діапазони ефективної кількості є лише

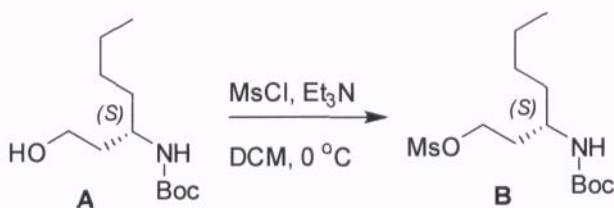
рекомендаціями та не призначені для обмеження тим чи іншим чином обсягу або застосування даного винаходу.

Одержання сполук формули (I)

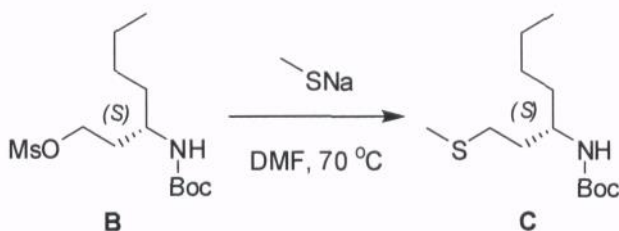
Загальна схема. Сполуку А одержували згідно з процедурами, описаними у WO2008147697 та WO2009067081.



Експериментальна частина

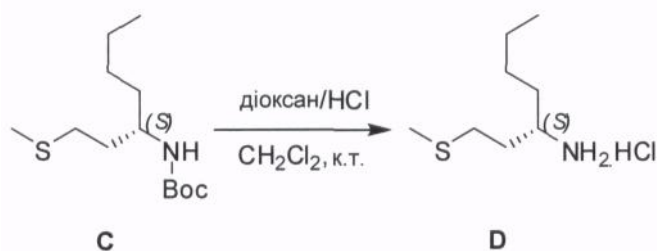


Триетиламін (10,5 г, 103,75 ммоль, 2,4 екв.) додавали до розчину А (10 г, 43,23 ммоль, 1 екв.) у CH_2Cl_2 (200 мл) при $0\text{ }^\circ\text{C}$. Метансульфонілхлорид (6,4 г, 55,87 ммоль, 1,3 екв.) додавали краплями до розчину та перемішували протягом 1,5 години при $0\text{ }^\circ\text{C}$. Додавали CH_2Cl_2 (500 мл). Розчин промивали водним розчином NaHCO_3 , сольовим розчином та висушували над Na_2SO_4 , згодом тверді речовини видаляли шляхом фільтрації, а розчинник для фільтрату видаляли під зниженим тиском з одержанням В. Його використовували безпосередньо без додаткового очищення.

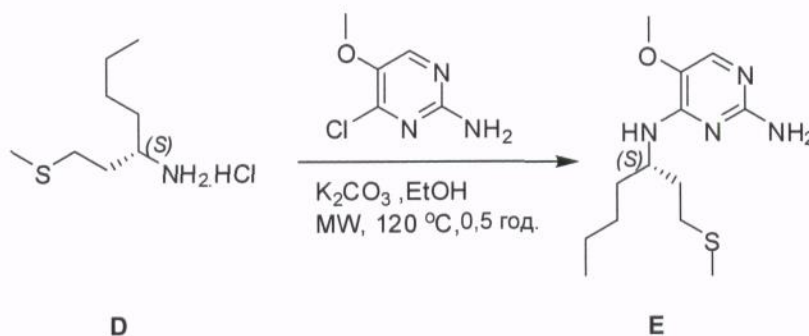


Суміш В (12 г, 38,782 ммоль, 1 екв.) та тіометоксиду натрію (4,08 г, 58,17 ммоль, 1,5 екв.) у DMF (60 мл) перемішували протягом ночі при 70 °С. Тверді речовини видаляли фільтрацією, й розчинники для фільтрату видаляли під зниженим тиском. Неочищений продукт розчиняли в етилацетаті, промивали водою, сольовим розчином, сушили над Na₂SO₄, згодом тверді речовини видаляли шляхом фільтрації, а розчинники для фільтрату видаляли під зниженим тиском. Неочищений продукт очищували за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (елюент: петролейний ефір/етилацетат від 40/1 до 3/1) з одержанням С.

¹H-ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ ppm 0,70-0,85 (m, 5 H), 1,15-1,49 (m, 13 H), 1,49-1,61 (m, 1 H), 1,61-1,80 (m, 1 H), 2,05 (s, 3 H), 2,38-2,50 (m, 2 H), 3,51 (br. s., 1 H), 4,25 (br. s., 1 H).

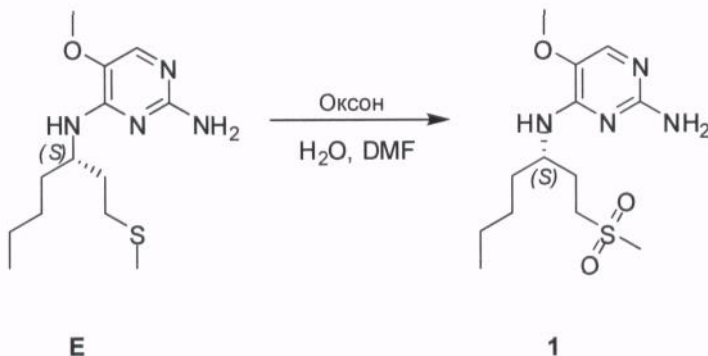


HCl/діоксан (47 мл, 187,43 ммоль, 10 екв.) додавали краплями до перемішаного розчину С (4,9 г, 18,74 ммоль, 1 екв.) у CH₂Cl₂ при 0 °С та перемішували протягом 1 години при 25 °С. Розчин концентрували під зниженим тиском з одержанням D. Його використовували на наступному етапі без додаткового очищення.



D (0,75 г, 3,79 ммоль, 1 екв.), 2-аміно-4-хлор-5-метоксипіримідин (0,908 г, 5,69 ммоль, 1,5 екв.) та K₂CO₃ (1,57 г, 11,38 ммоль, 3 екв.) змішували в етанолі (20 мл). Суміш перемішували при 120 °С у мікрохвильовій печі протягом 30 хвилин. Розчинник видаляли під зниженим тиском. Неочищений продукт очищували за допомогою препаративної тонкошарової хроматографії на силікагелі (елюент: CH₂Cl₂:CH₃OH = 20:1) з одержанням E.

¹H-ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ ppm 1,05-1,15 (m, 3 H), 1,40-1,60 (m, 4 H), 1,95 (m, 2H), 2,15 (m, 1 H), 2,30 (d, 3 H), 2,70 (t, 1 H), 2,90 (t, 1 H), 3,55 (m, 1 H), 4,50 (m, 1 H), 3,95 (s, 3 H), 6,20 (d, 1H), 6,60 (br. s., 2 H), 7,45 (s, 1 H).

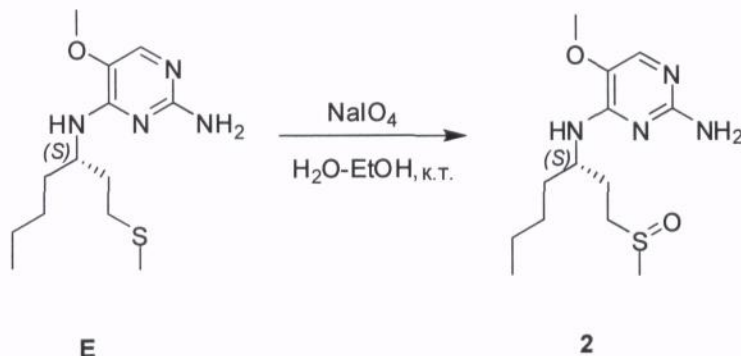


Оксон (6,959 г, 11,32 ммоль, 3 екв.) додавали до розчину E (1,45 г, 3,773 ммоль, 1 екв.) у DMF (100 мл) та воді (100 мл). Суміш перемішували протягом 12 годин при 20 °С. Тверді речовини видаляли шляхом фільтрації, й фільтрат підлучували до pH = 8, використовуючи насичений водний розчин Na₂CO₃. Одержану в результаті суміш концентрували під зниженим тиском. Залишок очищували за допомогою препаративної високоефективної рідинної

хроматографії (колонка: Gemini 150 x 30 мм x 5 мкм, C18, рухома фаза: CH₃CN/вода (0,05% HCl), градієнт: 2-32% CH₃CN, 0-8 хв., швидкість потоку: 30 мл./хв.). Найкращі фракції об'єднували та концентрували під зниженим тиском з одержанням 1.

LC-MS: 3,88 хв.

- 5 ¹H-ЯМР (400 МГц, метанол-d₄) δ ppm 0,92 (t, J = 6,9 Гц, 3 H), 1,21-1,50 (m, 4 H), 1,69 (q, J = 7,1 Гц, 2 H), 1,95-2,28 (m, 2 H), 2,98 (s, 3 H), 3,09-3,22 (m, 2 H), 3,87 (s, 3 H), 4,37-4,55 (m, 1 H), 7,26 (s, 1 H), рухливих протонів не спостерігали.



- 10 Розчин E (40 мг, 0,14 ммоль, 1 екв.) в етанолі (40 мл) обробляли розчином NaIO₄ (0,2 г, 1 ммоль, 7,5 екв.) у воді (10 мл), а згодом перемішували за кімнатної температури протягом ночі. Розчин концентрували під вакуумом. Залишок розводили водою та екстрагували етилацетатом. Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином, сушили над Na₂SO₄, тверді речовини видаляли шляхом фільтрації, а розчинник для фільтрату видаляли під зниженим тиском.
- 15 Неочищений продукт очищували за допомогою препаративної вискоєфективної рідинної хроматографії (колонка C18, елюент: CH₃CN, H₂O від 3/97 до 33/67, 0,05% HCl). Необхідні фракції збирали та концентрували під вакуумом з одержанням 2.

LC-MS: 3,78 хв.

- 20 ¹H-ЯМР (400 МГц, метанол-d₄) δ ppm 0,90 (t, J = 6,8 Гц, 3 H), 1,19-1,49 (m, 4 H), 1,67 (d, J = 6,5 Гц, 2 H), 1,91-2,15 (m, 2 H), 2,63 (br. s., 3 H), 2,69-2,96 (m, 2 H), 3,85 (s, 3 H), 4,46 (br. s., 1 H), 7,25 (s, 1 H), рухливих протонів не спостерігали.

Аналітичний спосіб LC-MS

| Колонка | YMC-PACK ODS-AQ, 50 × 2,0 мм, 5 мкм | | |
|---------------------|-------------------------------------|-----|----|
| Рухома фаза | A: H ₂ O (0,1% TFA) | | |
| | B: ацетонітрил (0,05% TFA) | | |
| | Час (хв.) | A% | B% |
| | 0 | 100 | 0 |
| | 1 | 100 | 0 |
| | 5 | 40 | 60 |
| Швидкість потоку | 7,5 | 40 | 60 |
| | 8 | 100 | 0 |
| Швидкість потоку | 0,8 мл/хв. | | |
| Довжина хвилі | УФ 220 нм | | |
| Температура колонки | 50 °C | | |
| Полярність у MS | Позитивна | | |
| LCMS | Agilent 1100 | | |

- 25 Біологічна активність сполук формули (I)
Опис біологічних аналізів Оцінка активності TLR7 та TLR8
Здатність сполук до активації TLR7 та/або TLR8 людини оцінювали в клітинному аналізі з репортерним геном з використанням клітин HEK293, підданих транз'єнтній трансфекції вектором експресії TLR7 або TLR8 та репортерною конструкцією NFκB-luc.
- 30 Коротко, клітини HEK293 вирощували в культуральному середовищі (DMEM, доповнене 10% FCS та 2 mM глутаміном). Для трансфекції клітин у чашках на 15 см клітини розділяли трипсином-EDTA, трансфікували сумішшю плазміді CMV-TLR7 або TLR8 (1700 нг), плазміді NFκB-luc (850 нг) та трансфекційного реагенту та інкубували протягом 48 год. при 37 °C у зволоженій атмосфері з 5% CO₂. Трансфіковані клітини згодом відмивали в PBS, розділяли

трипсином-

EDTA та ресуспендували в середовищі до щільності $1,25 \times 10^5$ клітин/мл. Сорок мікролітрів клітин згодом розподіляли в кожну лунку 384-лункових планшетів, де вже містилося 200 нл сполуки в 100% DMSO. Через 6 годин інкубування при 37°C у 5% CO_2 визначали люциферазну активність шляхом додавання 15 мкл субстрату Steady Lite Plus (Perkin Elmer) у кожну лунку та зчитування показників, здійснюваного на пристрої формування зображень для мікропланшетів ViewLux (Perkin Elmer) для ультра-HTS. Криві залежності доза-ефект були побудовані на основі вимірювань, виконаних у чотирьох повтореннях. Для кожної сполуки визначали значення найменшої ефективної концентрації (LEC), яку визначали як концентрацію, що викликає ефект, який щонайменше вдвічі перевищує стандартне відхилення в аналізі.

Токсичність сполук визначали паралельно з використанням однакових серій розведень сполуки з 40 мкл на лунку клітин, трансфікованих лише конструкцією CMV-TLR7 ($1,25 \times 10^5$ клітин/мл), у 384-лункових планшетах. Життєздатність клітин визначали через 6 годин інкубування при 37°C у 5% CO_2 шляхом додавання 15 мкл ATPlite (Perkin Elmer) на лунку та зчитування показників на пристрої формування зображень для мікропланшетів ViewLux (Perkin Elmer) для ультра-HTS. Дані представляли як CC_{50} .

Паралельно використовували подібні серії розведень сполуки (200 нл сполуки в 100% DMSO) з 40 мкл на лунку клітин, трансфікованих лише репортерною конструкцією NF κ B-luc ($1,25 \times 10^5$ клітин/мл). Через шість годин після інкубування при 37°C у 5% CO_2 визначали люциферазну активність шляхом додавання 15 мкл субстрату Steady Lite Plus (Perkin Elmer) у кожну лунку та зчитування показників, здійснюваного на пристрої формування зображень для мікропланшетів ViewLux (Perkin Elmer) для ультра-HTS. Дані зворотного скринінгу представляли як LEC.

Активація промоторних елементів ISRE

Здатність сполук до індукції IFN-I також оцінювали шляхом визначення активації інтерферон-залежних регуляторних елементів (ISRE) із використанням середовищ, кондиціонованих PBMC. Елемент ISRE послідовності GAAACTGAACT є високочутливим до фактора транскрипції STAT1-STAT2- IRF9, що активується під час зв'язування IFN-I з його рецептором IFNAR (Clontech, PT3372-5W). Плазміда pISRE-Luc від Clontech (зразок 631913) містить

5 копій даного елемента ISRE, після якого розташовується ORF гена люциферази світляка. Створювали лінію клітин HEK293, стабільно трансфіковану за допомогою pISRE-Luc (HEK-ISRE-luc), для визначення профілів у культуральних середовищах, кондиціонованих клітинами PBMC.

Коротко, PBMC одержували з лейкоцитарних плівок від щонайменше двох донорів з використанням стандартного протоколу центрифугування з фіколом. Виділені PBMC ресуспендували в середовищі RPMI, доповненому 10% сироваткою крові групи AB людини, та 2×10^5 клітин/лунка розподіляли в 384- лункові планшети, які містили сполуки (загальний об'єм 70 мкл). Після інкубації протягом ночі 10 мкл надосадової рідини переносили в 384-лункові планшети, які містили 5×10^3 клітин HEK-ISRE-luc/лунка в 30 мкл (висіяних за добу до цього). Через 24 години інкубування активацію елементів ISRE визначали шляхом проведення аналізу люциферазної активності з використанням 40 мкл/лунка субстрату Steady Lite Plus (Perkin Elmer) і визначали за допомогою пристрою формування зображень для мікропланшетів ViewLux (Perkin Elmer)

для ультра-HTS. Активність кожної сполуки щодо стимуляції клітин HEK-ISRE-luc представляли у формі величини LEC, яку визначали як концентрацію сполуки, використовуваної щодо PBMC, яка зумовлює люциферазну активність, що перевищує стандартне відхилення в аналізі щонайменше вдвічі. LEC, своєю чергою, вказує на ступінь активації ISRE після перенесення певної кількості культурального середовища для PBMC. Рекомбінантний інтерферон α -2a (роферон-А) використовували як стандартну контрольну сполуку.

Таблиця 1

БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ

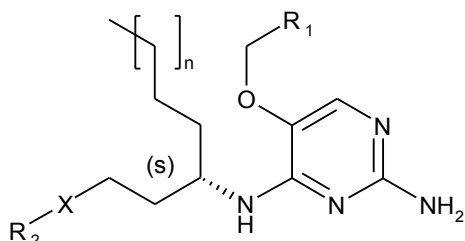
| № | TLR 7 людини (LEC), мкМ | TLR 8 людини (LEC), мкМ | HEK-ISRE-luc (LEC), мкМ |
|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 1 | 2,0 | 1,7 | 0,65 |
| 2 | 1,4 | 9,2 | 4,8 |
| 3 | 3,9 | 10 | NA |

NA = дані відсутні. Всі сполуки показали відсутність токсичності аж до найвищої концентрації, що тестувалась. Всі сполуки показали відсутність активності (LEC >25 мкМ) в аналізі за типом зворотного скринінгу HEK 293 з NF-κB, описаному вище.

5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Сполука формули (I)



або її фармацевтично прийнятна сіль, де

10

X являє собою S, S=O або O=S=O,

R₁ являє собою водень, (C₁₋₆)-алкіл, (C₁₋₆)-алкокси або арил,

R₂ являє собою (C₁₋₃)-алкіл або (C₃₋₆)-циклоалкіл, і

n=1 або 2.

15

2. Фармацевтична композиція, яка містить сполуку формули (I) або її фармацевтично прийнятну сіль за п. 1 разом з одним або декількома фармацевтично прийнятними наповнювачами, розріджувачами або носіями.

3. Застосування сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі за п. 1 або фармацевтичної композиції за п. 2 як лікарського препарату.

20

4. Застосування сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі за п. 1 або фармацевтичної композиції за п. 2 в лікуванні порушення, в яке залучена модуляція TLR7 та/або TLR8.

Комп'ютерна верстка О. Рябко

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601