

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201691997** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2017.02.28**

(51) Int. Cl. *A61K 31/4439* (2006.01)  
*A61P 25/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2015.04.01**

---

(54) **ПРОИЗВОДНЫЕ 2,4-ТИАЗОЛИНИДОНА В ЛЕЧЕНИИ РАССТРОЙСТВ  
ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**

---

(31) **14382130.4**

(32) **2014.04.02**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2015/057224**

(87) **WO 2015/150476 2015.10.08**

(71) Заявитель:

**МИНОРИКС ТЕРАПЬЮТИКС С.Л.  
(ES)**

(72) Изобретатель:

**Гарсия Кольасо Ана Мария (ES),  
Экланд Дэвид Джон Аугустус (GB),  
Пискуэта Лаланса Мария Пилар,  
Мартинель Педемонте Марк (ES)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к 5-(4-(2-(5-(1-гидроксиэтил)пиридин-2-ил)этокси)бензил)тиазолидин-2,4-диону и новым стереоизомерам указанного соединения для применения в лечении расстройств центральной нервной системы (НС).

**201691997 A1**

**201691997**

**A1**

## ПРОИЗВОДНЫЕ 2,4-ТИАЗОЛИДИНОНА В ЛЕЧЕНИИ РАССТРОЙСТВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новым применениям производных 2,4-тиазолидиндиона в качестве лекарственных средств, в частности, для лечения расстройств центральной нервной системы.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Расстройства центральной нервной системы (ЦНС) представляют собой заболевания любого компонента головного мозга и спинного мозга. Расстройства ЦНС включают расстройства, при которых нервная система страдает в течение всего прогрессирования заболеваний, таких как нейродегенеративные заболевания, (например, болезнь Альцгеймера, хорея Гентингтона, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз (ALS), дегенеративные атаксии, такие как атаксии Фридриха, рассеянный склероз, множественная системная атрофия и лейкодистрофии), цереброваскулярные заболевания (например, общая или локальная ишемия, внутримозговое кровоизлияние, инсульт), судороги и эпилепсия, вирусные заболевания (например, менингит, энцефалит), опухоли мозга и нейровоспалительные заболевания. Расстройства ЦНС также включают расстройства, при которых нервная система подвергается воздействию только в течение последних стадий развития заболевания. Эти нарушения включают редкие метаболические заболевания, такие как органические ацидемии или нарушения жирных кислот и генетические митохондриальные нарушения.

Нейродегенеративные заболевания характеризуются прогрессирующей потерей структуры или функции нейронов, в том числе гибелью нейронов. Эти состояния прогрессируют и часто приводят к летальному исходу. Процесс нейродегенерации не очень хорошо изучен, и болезни, которые вытекают из его наличия, пока еще не излечиваются, несмотря на постоянный поиск способов лечения. Некоторые нейродегенеративные заболевания включают также воспалительный компонент, такой как рассеянный склероз,

который традиционно считался воспалительным опосредованным демиелинизирующим заболеванием, но, по сути, представляет собой нейродегенеративное заболевание, при котором повреждение аксонов, гибель нейронов и атрофия ЦНС являются основными причинами необратимой неврологической инвалидности у пациентов. Таким образом, рассеянный склероз можно рассматривать как нейродегенеративное заболевание, но также и как нейровоспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание.

Лейкодистрофии представляют собой группу общих расстройств ЦНС, основной особенностью которых является дегенерация белого вещества в головном мозге. Одним расстройством этой группы является адренолейкодистрофия (X-хромосомная адренолейкодистрофия или X-ALD). Это редкое наследственное заболевание, которое приводит к прогрессирующему повреждению головного мозга и других тканей и в конечном итоге к смерти. Это заболевание можно рассматривать и как нейродегенеративное, и как нейровоспалительное.

X-ALD представляет три основных фенотипа: (I) адреномиелоневропатия взрослых (AMN) с аксонопатией в спинном мозге, (II) церебральная адреномиелоневропатия с демиелинизацией мозга (сAMN) и (III) детский вариант (сALD), характеризующийся выраженной церебральной демиелинизацией. X-ALD является наиболее часто наследуемой лейкодистрофией, с минимальным частотой 1 на 17000, включая гемизиготных мужчин и женщин-носителей.

Цереброваскулярные заболевания являются группой мозговых дисфункций, связанных с болезнью кровеносных сосудов, снабжающих мозг. Их существует четыре типа: инсульт, транзиторная ишемическая атака (ТИА), субарахноидальное кровоизлияние и сосудистая деменция.

Эпилепсия является непредсказуемым, серьезным и потенциально смертельным заболеванием нервной системы. Около 50 миллионов человек во всем мире страдают эпилепсией.

Опухоли головного мозга образуются аномальным и неконтролируемым делением клеток не только в головном мозге (нейронов или глиальных клеток), но и в кровеносных сосудах,

черепно-мозговых нервах, мозговых оболочках, черепа и гипофиза или шишковидной железы. Опухоли головного мозга также включают такие, которые распространились из первичных злокачественных клеток, расположенных в других органах (метастазирование).

Вирусные заболевания нервной системы вызываются вирусными инфекциями в ЦНС. Эти инфекции могут вызывать неврологические дисфункции и потенциально серьезные воспалительные заболевания, такие как энцефалит, воспаление собственно мозга, менингит, которые приводят к воспалению мозговых оболочек или миелиту, что означает воспаление спинного мозга. Бешенство, корь, эпидемический паротит, полиомиелит, вирус простого герпеса или ветрянка являются типами вирусных инфекций нервной системы.

Редкие болезни обмена веществ (также известные как врожденные нарушения метаболизма), как правило, представляют собой моногенные заболевания, при которых нарушаются определенные метаболические пути, порождая тем самым во многих случаях дисфункции в центральной НС. Они являются хронически изнурительными и опасными для жизни состояниями.

Генетические митохондриальные заболевания могут быть вызваны мутациями либо в мтДНК, либо в нДНК, которые нарушают митохондриальную функцию и, как правило, приводят к очень тяжелой мультисистемной болезни от рождения, в том числе тяжелым проявлениям в ЦНС. Существует острая потребность в новых способах лечения расстройств центральной ЦНС.

Широкое разнообразие обогащенных дейтерием 2,4-тиазолидиндионов было описано в патенте США 2014/0275180. Этот документ также раскрывает их пророческое применение при лечении множества различных заболеваний. Тем не менее, этот документ не предоставляет никаких доказательств в этом отношении или в отношении способности этих соединений проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ).

Пиоглитазон является препаратом, продаваемом для применения при лечении сахарного диабета 2-го типа. Пиоглитазон является сильнодействующим агонистом пероксисомного пролифератор-активированного рецептора-гамма (PPAR $\gamma$ ), и он был

предложен для лечения некоторых нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, ALS и атаксии Фридрейха. US2013 /0274295 раскрывает полезность пиоглитазона при лечении X-ALD на основе доклинических данных. Хотя доклинические модели показали многообещающие результаты, в клинических испытаниях на сегодняшний день не удалось показать клинические преимущества в любом из этих чрезвычайно серьезных состояний.

Кроме того, пиоглитазон был связан с нежелательными побочными эффектами, включая действие на сердечно-сосудистую систему, задержку жидкости, увеличение массы и рак мочевого пузыря. Поэтому высокие дозы пиоглитазона нежелательны, так как интенсивное системное воздействие, по-видимому, приводило бы к серьезным побочным эффектам.

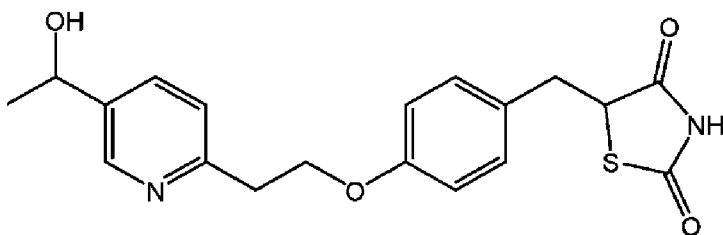
Пиоглитазон является «грязным» лекарственным средством, которое преобразовывается во многие метаболиты *in vivo*. Метаболический путь пиоглитазона после перорального введения изучали у некоторых видов животных и у человека, и его метаболиты были описаны в литературе (смотри, например, Sohda *et al*, Chem. Pharm. Bull., 1995, 43(12), 2168-2172) и Maeshiba *et al*, *Arzneim.-Forsch/Drug Res*, 1997, 47 (I), 29-35). По меньшей мере шесть метаболитов были определены, и они получили название с M-I по M-VI. Среди этих метаболитов M-II, M-III и M-IV показывают некоторую фармакологическую активность, но менее активны, чем пиоглитазон в диабетических доклинических моделях.

Распределение пиоглитазона и его метаболитов в различных тканях после перорального введения [<sup>14</sup>C]-пиоглитазона крысам также изучали (Maeshiba *et al*, *Arzneim.-Forsch/Drug Res*, 1997, 47 (I), 29-35). В большинстве тканей концентрации пиоглитазона и метаболитов M-I и M-VI были ниже, чем в плазме, и одна из самых низких концентраций радиоактивности была обнаружена в мозге, где в основном детектировался только пиоглитазон.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Неожиданно было обнаружено, что расстройства ЦНС можно лечить с помощью 5-[4-[2-(5-(1-гидроксиэтил)-2-пиридирил)этокси]бензил]-2,4-тиазолидиндиона с формулой (1), метаболита

М-IV пиоглитазона,



(1)

или его соли.

Расстройства ЦНС включают в себя, в качестве неограничивающих примеров, расстройства, в которых нервная система подвергается воздействию в течение всего прогрессирования заболеваний, таких как нейродегенеративные заболевания (например, болезнь Альцгеймера, хорея Гентингтона, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз (ALS), дегенеративные атаксии, множественная системная атрофия и лейкоцистоз), цереброваскулярные заболевания (например, глобальная или локальная ишемия, внутримозговое кровоизлияние, инсульт), судороги и эпилепсия, вирусные заболевания (например, менингит, энцефалит), рассеянный склероз, опухоли головного мозга, а также травмы. Расстройства ЦНС также включают расстройства, при которых на нервную систему оказываются влияние только на последних стадиях развития состояния, и включают редкие метаболические заболевания, такие как органические ацидемии или нарушения жирных кислот и генетические митохондриальные нарушения.

Изобретение основано, по меньшей мере, частично на основе данных, свидетельствующих о неожиданной способности соединения с формулой (1) преодолевать гематоэнцефалический барьер. Кроме того, соединение по настоящему изобретению имеет одно или более желательных свойств лекарственного препарата, таких как высокая биодоступность при пероральном введении, низкое системное выведение из плазмы и хороший объем распределения. Кроме того, соединение по настоящему изобретению является достаточно "чистым" лекарственным препаратом, поскольку *in vivo* он преобразуется только в 5-(4-(2-(5-ацетил-2-пиридил)этокси)бензил)-2,4-тиазолидиндион (метаболит М-III

пиоглитазона), и оба экскретируются. Следовательно, побочные эффекты, обусловленные нежелательными метаболитами, сводятся к минимуму.

Таким образом, в соответствии с одним аспектом настоящего изобретения предлагается соединение с формулой (1) или его фармацевтически приемлемые соли или смеси соединений с формулой (1) для использования в качестве лекарственного средства, в частности, для лечения или профилактики расстройств центральной НС. В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к применению соединения с формулой (1) или его фармацевтически приемлемых солей или смеси соединений с формулой (1) для получения лекарственного средства, в частности, для лечения или профилактики расстройств центральной НС. В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики заболевания центральной НС, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения с формулой (1) или его фармацевтически приемлемых солей или смеси соединений с формулой (1). В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции, содержащие соединение с формулой (1) или его фармацевтически приемлемые соли или смеси соединений с формулой (1).

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к новым соединениям (2) - (5):

(2) (R)-5-(4-(2-(5-((R)-1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил)этоксид) бензил) тиазолидин-2,4-дион

(3) (R)-5-(4-(2-(5-((S)-1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил)этоксид) бензил) тиазолидин-2,4-дион

(4) (S)-5-(4-(2-(5-((R)-1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил)этоксид) бензил) тиазолидин-2,4-дион

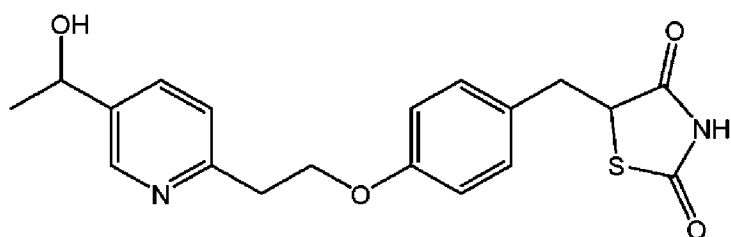
(5) (S)-5-(4-(2-(5-((S)-1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил)этоксид) бензил) тиазолидин-2,4-дион

или фармацевтически приемлемой соли этого.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к смеси одного или более из соединений от (2) до (5) или фармацевтически приемлемых солей этого для применения при

лечении или профилактике заболеваний центральной нервной системы. В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к использованию одного или нескольких соединений с (2) по (5) или фармацевтически приемлемых солей этого для получения лекарственного средства для лечения или профилактики расстройств центральной НС. В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики заболевания центральной НС, включающему введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества одного или нескольких соединений с (2) до (5) или фармацевтически приемлемых солей этого.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим одно или более соединений с формулой от (2) до (5) или фармацевтически приемлемые соли этого, в том числе смеси соединений с формулой от (2) до (5), для применения в лечении или профилактике расстройств центральной НС.



(1)

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики заболеваний центральной нервной системы, в том числе нейродегенеративных заболеваний (таких как болезнь Альцгеймера, хорea Хантингтона, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз (ALS), дегенеративные атаксии, множественная системная атрофия, рассеянный склероз и лейкодистрофии, такие как ALD), заболевания сосудов головного мозга, судороги, эпилепсия, вирусные заболевания, опухоли головного мозга, нейровоспалительные заболеваний, расстройства НС, которые оказывают влияние на нервную систему на последних стадиях развития состояния, в том числе редкие метаболические



заболевания, такие как органические ацидемии или нарушения жирных кислот и генетические митохондриальные нарушения, путем введения соединения с формулой (1) или его фармацевтически приемлемой соли, или одного или нескольких соединений с формулой от (2) до (5) или фармацевтически приемлемых солей этого.

#### Описание фигур

Фигура 1 представляет концентрацию соединения с формулой (1) в плазме крови мышей C57BL/6 после однократного внутривенного введения 1 мг/кг указанного соединения.

Фиг. 2 представляет концентрацию соединения с формулой (1) в плазме крови мышей C57BL/6 после однократного перорального введения 4,5 мг/кг указанного соединения.

Фиг. 3 представляет концентрацию соединения с формулой (1) в мозговой ткани мышей C57BL/6 после однократного перорального введения 4,5 мг/кг указанного соединения (линия с круглыми маркерами) и после однократного внутривенного введения 1 мг/кг указанного соединения (линия с квадратными маркерами).

Фиг. 4 представляет соотношение плазма-мозг, рассчитанное на основании уровней пиоглитазон, MIV, MIII и MII в плазме и мозге, выраженных количественно в Стах (максимальная концентрация) после перорального дозирования однократного введения пиоглитазона при 4,5 мг/кг самцам мышей C57BL/6.

Фиг. 5 представляет соотношение плазма-мозг, рассчитанное на основании фармакокинетических кривых профилей концентрация-время плазмы и мозга, рассчитанных как площадь под кривыми пиоглитазона и после перорального дозирования однократного введения либо пиоглитазона, либо MIV при 4,5 мг/кг для обоих самцам мышей C57BL/6.

Фиг. 6 представляет концентрации смеси (с), содержащей соединения (2) и (4), и смеси (d), содержащей соединения (3) и (5), в плазме мышей C57BL/6 после однократного перорального введения при 4,5 мг/кг указанных смесей.

Фиг. 7 представляет эффект соединения с формулой (1) в поврежденных глутаматом первичных кортикальных нейронах крыс.

Фиг. 8 представляет эффект соединения с формулой (1) в

первичной культуре чувствительных нейронов, поврежденных паклитакселом (таксолом).

Фигура 9 представляет эффект соединения с формулой (1) на оценку неспособности при исследовании эффективности *in vivo* в множественной мышинной модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ).

Фигура 10 представляет эффект соединения с формулой (1) на первичные двигательные нейроны, поврежденные глутаматом.

#### Описание предпочтительных вариантов осуществления

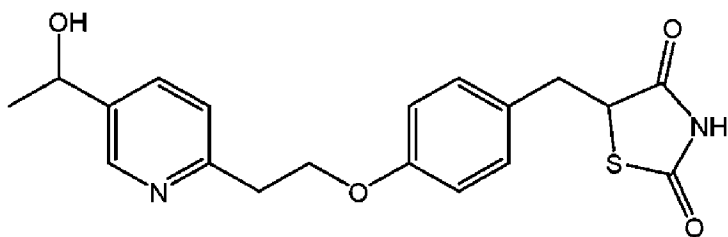
В настоящем изобретении термины "соединение с формулой (1)", "M-IV", "MIV" и "M4" неотличительно относятся к 5-[4-[2-(5-(1-гидроксиэтил)-2-пиридинил)этокси]бензил]-2,4-тиазолидиндиону, который имеет структуру, изображенную выше.

В одном из аспектов, введение соединения с формулой (1) или фармацевтически приемлемой соли является полезным для лечения или профилактики расстройств центральной НС, таких как нейродегенеративные заболевания (например, болезнь Альцгеймера, хорья Гентингтона, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз (ALS), дегенеративные атаксии, множественная системная атрофия, рассеянный склероз (MS) и лейкодистрофии, такие как аденолейкодистрофия (ALD или X-ALD), заболевания сосудов головного мозга (например, глобальная или локальная ишемия, внутримозговое кровоизлияние, инсульт), эпилептические припадки и эпилепсия, вирусные заболевания (например, менингит, энцефалит), опухоли мозга и нейровоспалительные заболевания. Расстройства НС также включают расстройства, в которых нервная система подвергается воздействию только на последних стадиях развития расстройства. Эти расстройства включают редкие метаболические заболевания, такие как органические ацидемии или нарушения жирных кислот и генетические митохондриальные нарушения.

Термин "лечение" или "лечить" в контексте настоящего описания относится к ослаблению или устранению заболевания или одного или более симптомов, ассоциированных с указанным заболеванием. "Лечение" также охватывает облегчение или устранение физиологических последствий болезни.

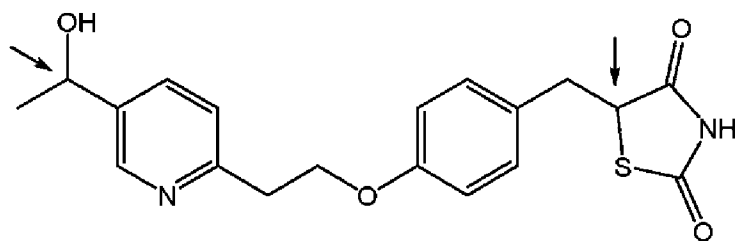
Термин "облегчение" в контексте настоящего изобретения следует понимать как любое улучшение в ситуации пациента, проходящего лечение.

Термин "предупреждение" или "предупреждать" относится к уменьшению риска приобретения или развития данного заболевания или расстройства, или снижению или ингибирование рецидива или заболевания или расстройства.



(1)

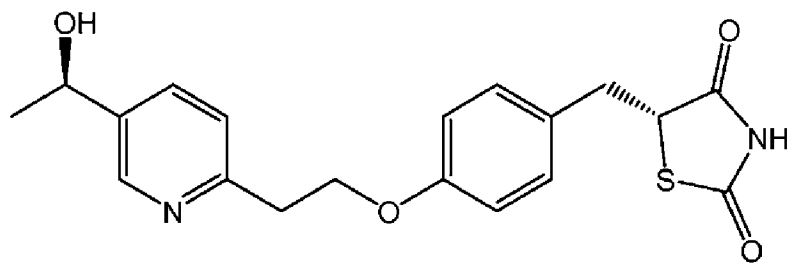
Соединение с формулой (1) может быть названо 5-(4-(2-(5-(1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил) этокси) бензил) тиазолидин-2,4-дионом, и оно имеет два хиральных центра. Одним из них является атом углерода в положении 5 тиазолидин-диона, а другой асимметричный атом находится в положении 1 гидроксипропиловой группы, как показано стрелками:



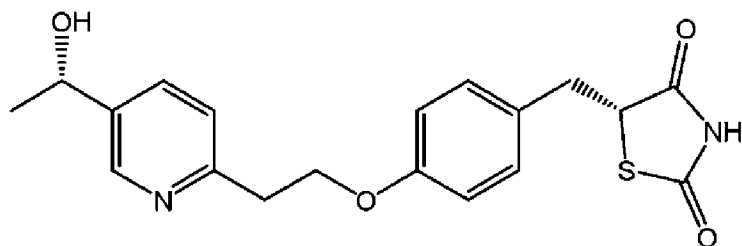
Используемый в данном описании термин "соединение с формулой (1)" используется для обозначения всех возможных стереоизомеров, включая энантиомеры и диастереомеры и их смеси, включая рацемические смеси.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к новым соединениям от (2) до (5):

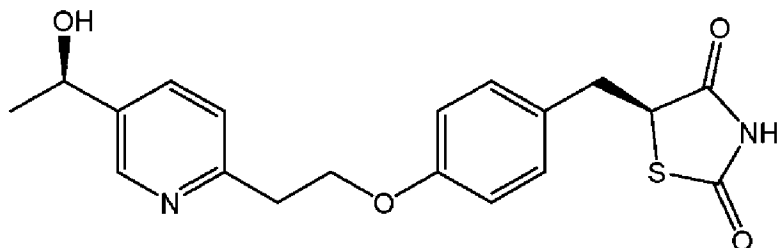
(2) (R)-5-(4-(2-(5-((R)-1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил) этокси) бензил) тиазолидин-2,4-дион



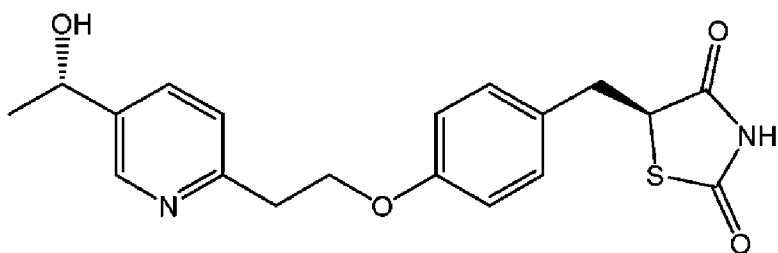
(3) (R)-5-(4-(2-(5-((S)-1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил)этоксип) бензил) тиазолидин-2,4-дион



(4) (S)-5-(4-(2-(5-((R)-1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил)этоксип) бензил) тиазолидин-2,4-дион



(5) (S)-5-(4-(2-(5-((S)-1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил)этоксип) бензил) тиазолидин-2,4-дион



или фармацевтически приемлемые соли этого.

Несмотря на то, что соединения с (2) по (5) были получены и выделены, их абсолютная (R/S) конфигурация до сих пор не была определена, а было определено только их оптическое вращение.

Предпочтительно, ссылка на соединения с (1) по (5), в настоящем изобретении предназначена для обозначения соединений с (1) по (5), имеющих атомы водорода, которые присутствуют преимущественно в форме его изотопа  $^1\text{H}$ , то есть не более 1% от

общего числа атомов водорода на моль соединения присутствует в виде изотопа  $^2\text{H}$  (дейтерий), еще более предпочтительно, не более чем 0,015% (что является природным содержанием дейтерия) от общего количества атомов водорода на моль соединения в виде изотопа  $^2\text{H}$  (дейтерия).

В конкретном варианте осуществления следующие смеси соединения (2) – (5) являются предпочтительными:

(a) Смеси, содержащие соединения (2) и (3), предпочтительно соединения (2) и (3) являются единственными соединениями с формулой (1), присутствующими в смеси;

(b) Смеси, включающие (4) и (5), предпочтительно соединения (4) и (5) являются единственными соединениями с формулой (1), присутствующими в смеси;

(c) Смеси, включающие (2) и (4), предпочтительно соединения (2) и (4) являются единственными соединениями с формулой (1), присутствующими в смеси; и

(d) Смеси, включающие (3) и (5), предпочтительно соединения (3) и (5) являются единственными соединениями с формулой (1), присутствующими в смеси.

Особенно предпочтительными являются смеси (c) и (d).

В смесях (a) – (d), упомянутых выше, особенно предпочтительно, что два соединения, указанные в каждой из смесей, присутствуют в эквимоларных количествах. Указанные смеси могут также содержать небольшие количества (предпочтительно, менее 10 мас.%, более предпочтительно, менее 3 мас.%, еще более предпочтительно менее 1 мас.% и наиболее предпочтительно, менее 0,1 мас.% других соединений с формулой (1).

Другой аспект настоящего изобретения относится к соединениям (2) – (5) или фармацевтически приемлемой соли этого, или смесям (a) – (d) или их фармацевтически приемлемым солям этого для применения в качестве лекарственных средств. Соединения по настоящему изобретению можно применять для лечения заболеваний, таких как расстройства центральной нервной системы среди других.

Для применения в лечении расстройств центральной НС

несколько факторов можно рассматривать при выборе предпочтительного соединения. Предпочтительным является соединение, показывающее высокую экспозицию мозга к плазме. Предпочтительное соединение показывает высокую активность агониста PPAR-гамма, однако соединения с менее сильной активностью агониста PPAR-гамма также являются полезными. Другие факторы, в том числе, в качестве неограничивающих примеров, фармакологическая активность (отличная от PPAR-гамма), ADME, фармакокинетический профиль, токсичность, безопасность, свойства распределения в мозге, накопление соединения в тканях, метаболизма и выведение соединения, генотипические вариации при выведении и физико-химические свойства могут также рассматриваться для выбора предпочтительного соединения. Предпочтительное соединение обладает низкой токсичностью в отношении центральной нервной системы. Предпочтительное соединение обладает низкой системной токсичностью. Наличие или отсутствие активности PPAR-альфа также может рассматриваться. В некоторых случаях желательно, чтобы соединение приводило к низкому или нулевому накоплению в головном мозге. Это может уменьшить риск токсичности центральной нервной системы и/или дать возможность быстрого реверсирования эффекта препарата в центральной нервной системе. В других случаях может быть предпочтительным высокое накопление мозга с ограниченным системным воздействием. Это может привести к повышению подверженности центральной нервной системы воздействию препарата и более высокой эффективности. Зачастую преимущественным для соединения является неподверженность значительным генотипическим вариациям в коэффициенте очищения. Это приводит к более сходной эффективности. Эти активности можно определить путем использования соответствующих анализов *in vitro* и *in vivo*.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики заболеваний центральной НС, в том числе нейродегенеративных заболеваний, заболеваний сосудов головного мозга, судорог, эпилепсии, вирусных заболеваний, опухолей головного мозга и нейровоспалительных болезней. Аспект

также включает способ лечения или профилактики расстройств центральной НС, при которых нервная система подвергается воздействию только на последних стадиях развития расстройства, включающего редкие метаболические заболевания, такие как органические ацидемии или нарушения жирных кислот и генетические митохондриальные нарушения, путем введения соединения с формулой (2) - (5) или фармацевтически приемлемой соли этого, или путем введения смеси одного или нескольких соединений с формулой (2) - (5).

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению соединения с формулой (1) или его фармацевтически приемлемой соли, или одного или нескольких соединений с формулой (2) - (5) или фармацевтически приемлемых солей этого, или смесей с (a) до (d) или фармацевтически приемлемых солей этого, для получения лекарственного средства для лечения или профилактики расстройств центральной НС, в том числе нейродегенеративных заболеваний, заболеваний сосудов головного мозга, судорог, эпилепсии, вирусных заболеваний, опухолей головного мозга и нейровоспалительных болезней. Аспект также включает в себя применение соединения с формулой (1) или его фармацевтически приемлемой соли, или одного или нескольких соединений с формулой (2) - (5) или фармацевтически приемлемых солей этого, или смесей с (a) до (d) или фармацевтически приемлемых солей этого, для получения лекарственного средства для лечения или профилактики расстройств центральной НС, при которых нервная система подвергается воздействию только на последних стадиях развития расстройства, включающего редкие метаболические заболевания, такие как органические ацидемии или нарушения жирных кислот и генетические митохондриальные нарушения.

Другой аспект настоящего изобретения относится к соединению с формулой (1) или его фармацевтически приемлемой соли, или одного или нескольких соединений с формулой (2) - (5) или фармацевтически приемлемых солей этого, или смесей с (a) до (d) или фармацевтически приемлемых солей этого, для применения при лечении или профилактике заболеваний центральной НС, в том

числе нейродегенеративных заболеваний, заболеваний сосудов головного мозга, судорог, эпилепсии, вирусных заболеваний, опухолей головного мозга и нейровоспалительных болезней. Аспект также включает соединение с формулой (1) или его фармацевтически приемлемой соли, или одного или нескольких соединений с формулой (2) - (5) или фармацевтически приемлемых солей этого, или смесей с (a) до (d) или фармацевтически приемлемых солей этого, для применения в лечении или профилактике заболеваний центральной НС, при которых нервная система подвергается воздействию только на последних стадиях развития расстройства, включающего редкие метаболические заболевания, такие как органические ацидемии или нарушения жирных кислот и генетические митохондриальные нарушения.

В конкретных вариантах осуществления аспектов настоящего изобретения, описанного выше, расстройство выбрано из группы, состоящей из нейродегенеративных заболеваний, заболеваний сосудов головного мозга, судорог, эпилепсии, вирусных заболеваний и опухолей мозга, более предпочтительно заболевание представляет собой нейродегенеративное заболевание; более предпочтительно, заболевание выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, хореи Гентингтона, болезни Паркинсона, атаксии Фридрейха, ALS рассеянного склероза и X-ALD; более предпочтительно, заболевание выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, хореи Гентингтона, болезни Паркинсона или рассеянного склероза; более предпочтительно, заболевание представляет собой рассеянный склероз; более предпочтительно, заболевание представляет собой лейкодистрофию, такую как аденолейкодистрофию (ALD или X-ALD).

В других конкретных вариантах осуществления аспектов настоящего изобретения, описанного выше, заболевание представляет собой заболевание сосудов головного мозга.

Предпочтительное соединение или смеси соединений могут быть выбраны для конкретного способа доставки. Некоторые соединения или смеси соединений также могут быть предпочтительными в зависимости от их применения для лечения конкретного заболевания.



Соединения по изобретению могут быть в форме фармацевтически приемлемой соли. Термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к солям, полученным из фармацевтически приемлемых неорганических и органических кислот.

Иллюстративные фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли соединений по настоящему изобретению могут быть получены из следующих кислот, в том числе, в качестве неограничивающих примеров, муравьиной, уксусной, пропионовой, бензойной, уксусной, пропионовой, бензойной, янтарной, гликолевой, глюконовой, молочной, малеиновой, яблочной, винной, лимонной, азотной, аскорбиновой, глюкуроновой, малеиновой, фумаровой, пировиноградной, аспарагиновой, глутаминовой, бензойной, соляной, бромистоводородной, иодистоводородной, изолимонной, ксинафоевой, винной, трифторуксусной, памоиновой, пропионовой, антраниловой, мезиловой, нападисилата, щавелевоуксусной, олеиновой, стеариновой, салициловой, р-гидроксibenзойной, никотиновой, фенилуксусной, миндальной, эмбоновой (памоиновой), метансульфоновой, фосфорной, фосфоновой, этансульфоновой, бензолсульфоновой, пантотеновой, толуолсульфоновой, 2- гидроксietансульфоновой, сульфаниловой, серной, салициловой, циклогексиламинсульфоновой, альгиновой,  $\beta$ - оксимасляной, галактаровой и галактуроновой кислоты. Типичные фармацевтически приемлемые соли включают соли соляной кислоты и бромистоводородной кислоты.

Полезность соединения с формулой (1), в том числе стереоизомеров (2) - (5), смесей от (a) до (d) и фармацевтически приемлемой соли этого можно продемонстрировать в соответствующих анализах *in vitro* или *in vivo*, как описано в примерах.

Соединения по изобретению или их фармацевтически приемлемые соли можно применять в соответствии с изобретением, когда пациенту также вводят или в комбинации с одним или несколькими из другого терапевтического средства, выбранного из противовоспалительных и анальгетических средств, агонистов

допамина (например, леводопа), ингибиторов МАО-В, ингибиторов катехин О-метилтрансферазы (КОМТ), антихолинергических средств, других антипаркинсонических средств (например, амантадин), рецепторов antiNMDA (например, мемантин), ингибиторов холинэстеразы, ингибиторов АПФ, антагонистов глутамата (например, рилузон), антиоксидантов, иммуномодуляторов (например, финголимод, моноклональные антитела против CD52, CD25 и CD20, интерферон- $\beta$ -1a, натализумаба, лаквинимода, диметилфумарата), химиотерапевтических средств, средств заместительной ферментной терапии, средств субстратной редуцирующей терапии, кортикостероидов, антипролиферативных средств (например, метотрексат), противосудорожных препаратов, антикоагулянтов, гипотензивных средств и нейропротективных средств. Соединения по настоящему изобретению также могут применяться, когда пациент проходит генную терапию, трансплантацию костного мозга, глубокую стимуляцию мозга или лучевую терапию.

Фармацевтические композиции, содержащие соединения с (2) по (5), смеси с (a) по (d) или фармацевтически приемлемую соль, представляют собой еще один аспект данного изобретения. Можно применять любой подходящий способ введения. Например, любой из перорального, аппликационного, местного, накожного, подкожного, чрескожного, внутримышечного, парентерального, глазного, ректального, вагинального, ингаляционного, трансбуккального, сублингвального и интраназального способов доставки может быть пригоден. Пероральное введение может быть предпочтительным. Пероральные формы фармацевтических композиций могут быть твердыми или жидкими. Подходящие лекарственные формы могут представлять собой таблетки, капсулы, пилюли, гранулы, суспензии, эмульсии, сиропы или растворы. Предпочтительно фармацевтическая композиция представляет собой твердую форму, выбранную из группы, состоящей из таблеток, капсул, таблеток или гранул. Особенно предпочтительными являются таблетки. Также предпочтительными являются пероральные растворы или суспензии. Это предпочтительно, когда пациент имеет трудности при

глотании, например, в результате заболевания, или для гериатрического и педиатрического применения. Подъязычные препараты также являются предпочтительными.

Под "эффективным" количеством или "терапевтически эффективным количеством" лекарственного препарата или его фармакологически активного средства подразумевается нетоксичное, но достаточное количество лекарственного препарата или средства для обеспечения желаемого эффекта. Количество, которое является «эффективным», будет варьировать от индивидуума к индивидууму, в зависимости от возраста и общего состояния индивидуума, конкретного активного средства или средств, и тому подобное. Таким образом, не всегда можно определить точное "эффективное количество". Тем не менее, соответствующее "эффективное" количество в каждом отдельном случае может быть определено любым специалистом в данной области техники с использованием рутинного экспериментирования. Соответственно, доза активного средства будет зависеть от природы и степени развития состояния, возраста и состояния пациента и других факторов, известных специалистам в данной области техники. Типичная суточная доза составляет от 0,1 до 200 мг, предпочтительно от 20 до 200 мг, например, для взрослого 10-100 мг, принимаемые в виде однократной дозы без дополнительной дозы или в виде нескольких доз, например, от одного до трех раз в день. Соединения, описанные здесь, могут также вводиться в суточных дозах от 80 до 600 мг.

Фармацевтические композиции могут содержать обычные наполнители, известные в данной области техники, и могут быть получены обычными способами.

Фармацевтические композиции могут дополнительно содержать одно или более терапевтических средств. Комбинированное лечение можно применять одновременно, последовательно или раздельно, одним и тем же или различными способами, или до, во время и после хирургических процедур или вмешательства.

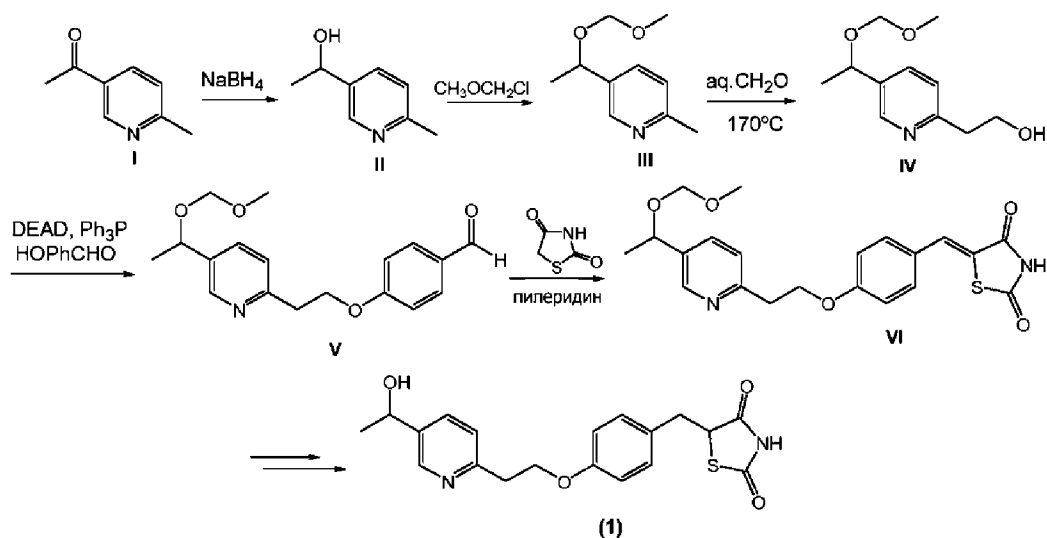
Соединения по настоящему изобретению можно получать любым подходящим способом, известным в данной области техники и/или способами, описанными ниже. Следует также иметь в виду, что

функциональные группы, такие как амино- или гидроксильные группы, которые присутствуют в различных описанных соединениях и которые желательно сохранить, возможно, должны быть в защищенной форме прежде, чем инициируется любая реакция. В таких случаях удаление защитной группы может быть конечной стадией в конкретной реакции. Подходящие защитные группы для такой совокупности функциональных характеристик очевидны специалистам в данной области. Для конкретных деталей смотри "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley Interscience, T W Greene, PGM Wuts. Любые смеси конечных продуктов или полученных промежуточных продуктов можно разделять известным способом на основе физико-химических различий составляющих на чистые конечные продукты или промежуточные продукты, например, с помощью хроматографии, дистилляции, фракционной кристаллизации или путем образования соли, в случае необходимости или возможности при данных условиях.

Соединения по настоящему изобретению могут быть получены с помощью следующих или аналогичных процессов.

Соединение 5-[4-[2-(5-(1-гидроксиэтил)-2-пиридилил)этокси]бензил]-2,4-тиазолидиндиона с формулой (1) можно получить в соответствии со схемой 1 (см, например, *J. Med. Chem.* 1996, 39(26), 5053).

Схема 1



Среди других способов, смесь соединений (2) и (4) или смесь соединений (3) и (5) по настоящему изобретению могут быть

получены, как на схеме 1, но с использованием энантиомерно чистых спиртов (IIa) и (IIb), в качестве исходных материалов.

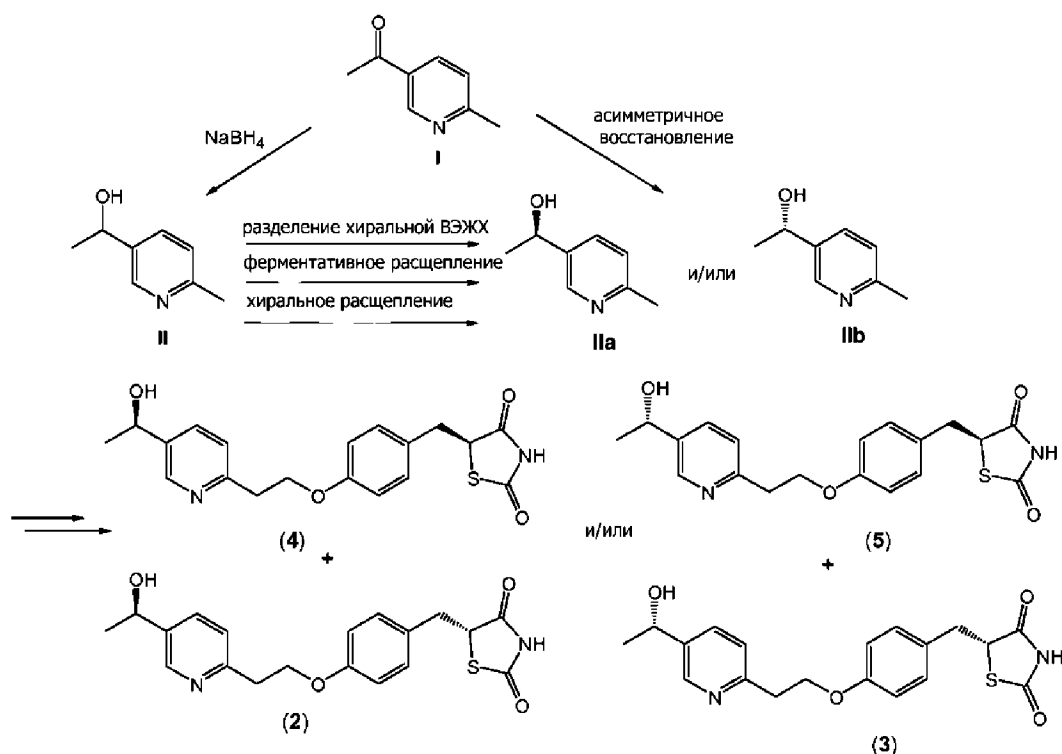
Промежуточные соединения формулы (IIa) и (IIb) могут быть получены в виде отдельных энантиомеров из рацемического спирта (II) с помощью одной или нескольких из следующих процедур (схема 2):

а) Разделение при помощи ВЭЖХ хиральной хроматографии с использованием хиральных колонок, доступных на рынке.

б) Ферментативный расщепляющая обработка смеси изомеров ферментом, таким как липаза, которая будет ацетилировать один из изомеров, оставляя другой изомер не вступившем в реакцию. Два изомера затем можно легко разделить.

с) Обработки смеси изомеров расщепляющим реагентом и разделении полученных диастереоизомеров путем кристаллизации или с помощью обычной колоночной хроматографии.

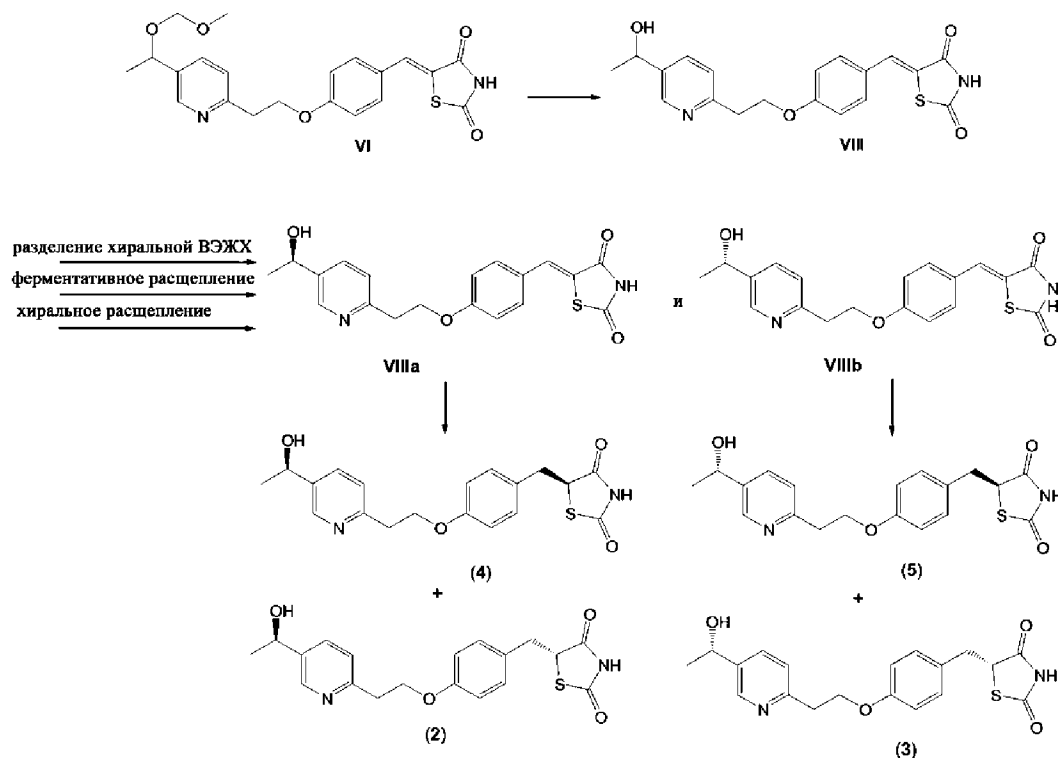
Схема 2



Альтернативный способ получения промежуточных продуктов (IIa) и (IIb) в виде отдельных энантиомеров путем хирального синтеза, с обработкой субстрата с формулой (I) подходящим хиральным восстанавливающим агентом, известным специалистам в данной области техники.

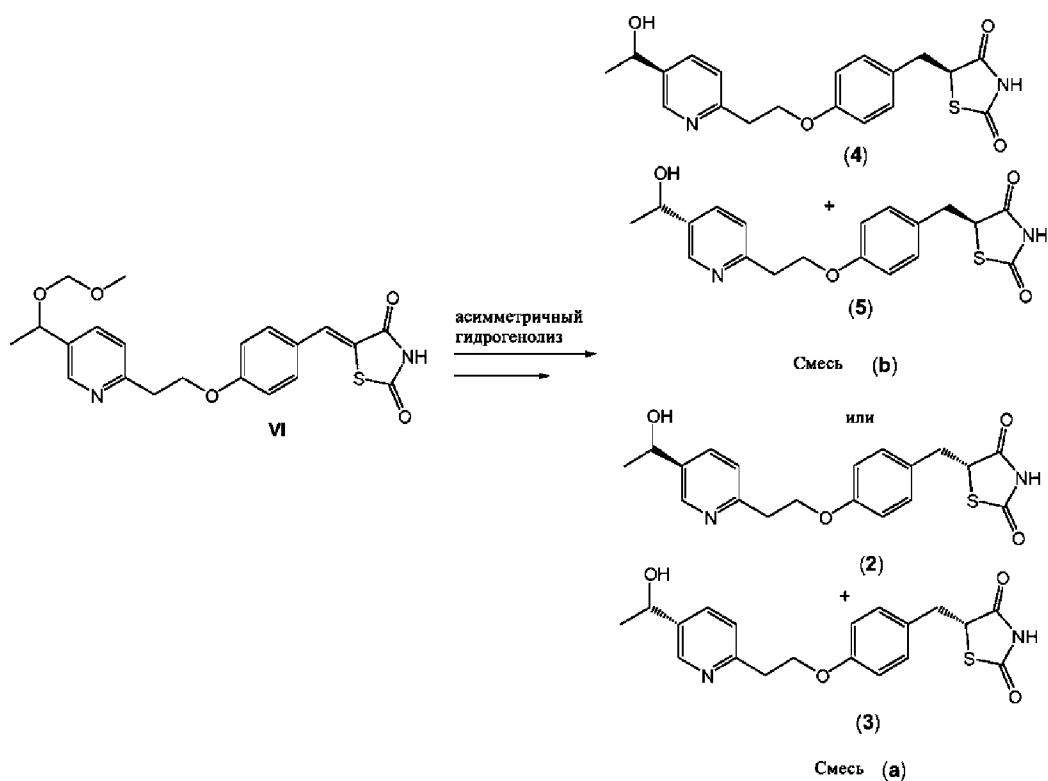
Еще один способ получения смесей (с) - содержащей соединения (2) и (4) - и (d) - содержащей соединения (3) и (5) - (схема 3), включает расщепление рацемической смеси VIII с использованием уже описанных способов (ВЭЖХ хиральное разделение, ферментативное разделение, хирального расщепление и т.д.) с последующим восстановлением двойной связи в каждой из энантиомеров VIIa и VIIb.

Схема 3



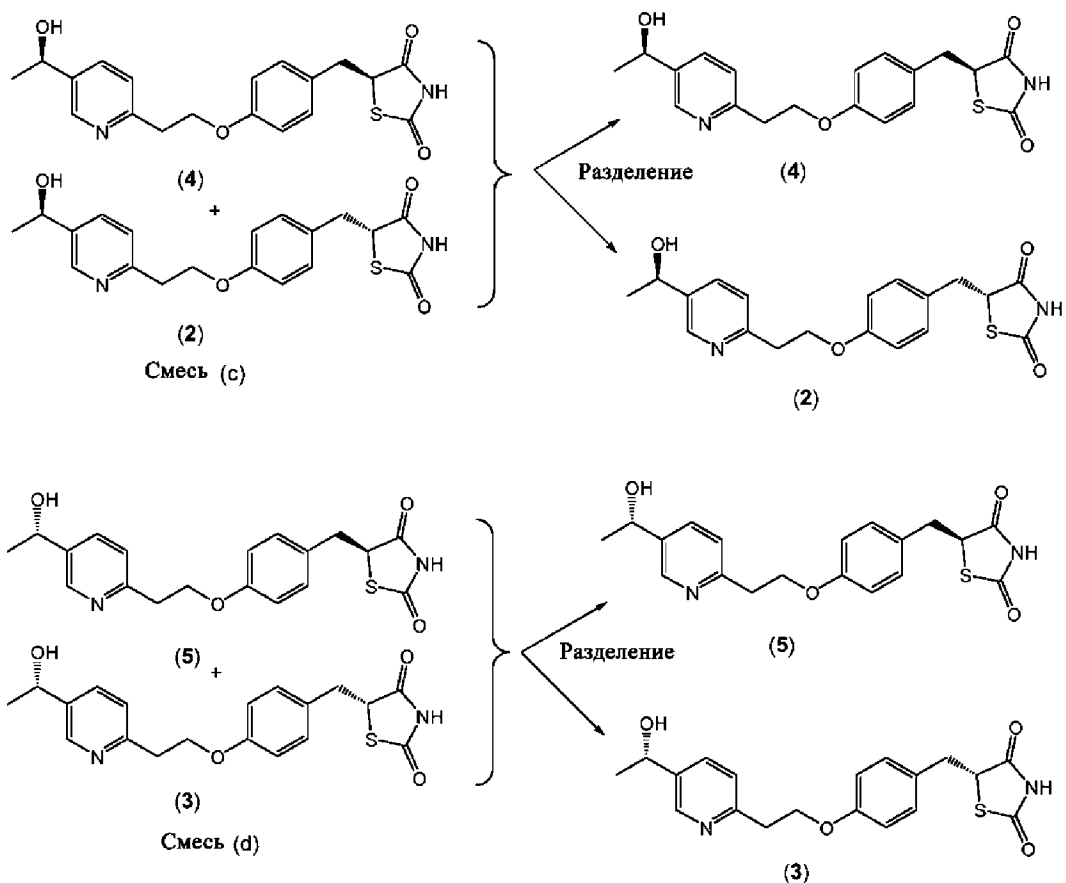
Смесь (b) (включающая соединения с формулой (4) и (5)) и смесь (a) (включающая соединения с формулой (2) и (3)) по настоящему изобретению могут быть получены с помощью асимметрического гидрирования соединения с формулой VI с использованием, например, родиевого или иридиевого катализатора в присутствии хиральных лигандов, как показано на Схеме 4. Хиральное восстановление двойной связи также может быть выполнено с использованием биокатализаторов (например, *Rhodotorula rubra* и *Rhodotorula glutinis*).

Схема 4



Соединения с формулой (2), (3), (4) и (5) могут быть получены из смесей (c) и (d) (Схема 45) с помощью хиральной ВЭЖХ разделения. В качестве альтернативы, желаемые энантиомерно чистые соединения могут быть получены с помощью хиральных синтетических процедур, известных специалистам в данной области техники (например, асимметричным гидронолизом соответствующего одного изомера соединения VI).

**Схема 5**



Сокращения :

АСЕ: ангиотензин-превращающий фермента

ADME: всасывание, распределение, метаболизм и экскреция

ALS: Боковой амиотрофический склероз

AMN: Аденомиелоневропатия

AUC: Площадь под кривой

Мышь C57BL/6: мышь C57 черная 6

CALD: Церебральный вариант ALD

cAMN: Церебральная аденомиелоневропатия

CD20: Антиген CD20 В-лимфоцитов

CD25: альфа-цепь рецептора интерлейкина-2

CD52: Кластер дифференциации 52

кДНК: Комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

Сmax: Пик концентрации в плазме после введения.

COMT: Катехол O-метилтрансфераза

DEAD: Диэтилазодикарбоксилат

EC<sub>50</sub>: Половина максимальной эффективной концентрации

hERG: Ген, родственник Ether-à-go-go человек



ВЭЖХ: Высокоэффективная жидкостная хроматография

LLoQ: Нижний предел количественного определения

MAO-B: Моноаминоксидаза В

мтДНК: Митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота

NMDA: N-метил-D-аспарагиновая кислота

ндНК: Ядерная дезоксирибонуклеиновая кислота

НС: Нервная система

Ph: Фенил

PPAR $\gamma$ : Пероксисомный пролифератор-активируемый рецептор-гамма

кПЦР: Количественная полимеразная цепная реакция

ТИА: Транзиторная ишемическая атака

Tmax: Время достижения Cmax

VSS: Наблюдаемый объем распределения в стационарном состоянии

X-ALD: X-сцепленная адренолейкодистрофия

Следующие примеры подтверждают изобретение.

**Пример 1:** Фармакокинетический профиль и распределение в мозге

Протокол: Были определены фармакокинетические параметры и распределение в мозге 5-(4-(2-(5-(1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил)этоксид)бензил)тиазолидин-2,4-диона (рацемата или стереоизомеров) после однократного перорального (4,5 мг/кг) и внутривенного (1 мг/кг) дозового введения самцам мышей C57 BL/6. Образцы крови и образцы мозга собирали перед дозированием и через различное время после введения дозы как для пероральной, так и для i.v. фармакокинетики. Все образцы обрабатывали для анализа путем осаждения белка с использованием ацетонитрила и анализировали с использованием целевого способа LC/MS/MS. Нижний предел количественного определения (LLoQ) в плазме и мозге для 5-(4-(2-(5-(1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил)этоксид)бензил)тиазолидин-2,4-диона (**1**) составляет 0,99 нг/мл. Фармакокинетические параметры были рассчитаны с использованием средств не-полигамного анализа Phoenix WinNonlin.

Результаты этих экспериментов показаны на фиг. 1, фиг. 2 и фиг. 3. Эти данные четко показывают, что 5-(4-(2-(5-(1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил) этокси) бензил) -тиазолидин-2,4-дион (1) обладает хорошим фармакокинетическим профилем, низким системным плазменным коэффициентом очищения и приемлемым объемом распределения ( $V_{ss}$ ) с отношением экспозиции мозг:плазма 0,12.

После однократного внутривенного введения рацемического 5-(4-(2-(5-(1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил) этокси) бензил) тиазолидин-2,4-диона (фиг. 1) мышам C57BL/6 в дозе 1 мг/кг, соединение демонстрировало низкий системный плазменный коэффициент очищения (11,79 мл/мин/кг, нормальной кровотока в печени у мышей=90 мл/мин/кг) с конечным периодом полувыведения из плазмы 1,79 ч.  $V_{ss}$  в 2 раза превышал нормальный объем общей воды организма (0,7 л/кг).

После однократного перорального введения рацемического 5-(4-(2-(5-(1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил) этокси) бензил) тиазолидин-2,4-дион (1) в C57BL/6 мышей в 4,5 мг/кг дозы (фиг. 2), не наблюдались концентрации в плазме до 24 ч (1 животное).  $T_{max}$  в плазме крови составляет 0,50 ч. Биодоступность при приеме внутрь составляет 85%.

ИНЖИР. 3 показывает, что концентрации мозга для обоих внутривенного и перорального фармакокинетические профили не наблюдались до 8 часов.  $T_{max}$  в головном мозге составляет 0,50 ч с мозга к плазме экспозиции ( $AUC_{Iast}$ ) отношение 0,12.

Эти результаты указывают на то, что 5-(4-(2-(5-(1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил) этокси) бензил) тиазолидин-2,4-дион имеет благоприятный фармакокинетический профиль в том числе хорошей биодоступностью и мозговой соотношение воздействие-плазмы 0,12, таким образом, соединение по значению пересекает гематоэнцефалический барьер.

**Пример 2:** Механизм действия: *in vitro* фармакология

Протокол: Для определения механизма действия через агонизм PPAR гамма проводили клеточный функциональный анализ с использованием рекомбинантной клеточной линии человека,

котрансфицированной PPRE люциферазным рецептором, PPAR-  $\gamma$ , RXR- $\alpha$  и коактиватором DRIP205.

Трансфицированных клетки обрабатывали возрастающими дозами соединений. Активность люциферазы детектировали при помощи технологии alphascreen и нормировали по  $\beta$ -галактозидазной активности. Результаты выражены в виде кратности индукции по сравнению с контролем (Розиглитазон 10 мкМ). Были получены кривые зависимости ответа от дозы. Результаты рассчитывали как EC<sub>50</sub>, которое представляет собой концентрацию соединения, которая вызывает 50% ответа контрольного агониста.

EC<sub>50</sub> рацемического 5-(4-(2-(5-(1-гидроксиэтил)пиридин-2-ил)этокси)бензил)тиазолидин-2,4-диона=9,3 мкМ.

Результаты этих экспериментов показывают, что рацемический 5-(4-(2-(5-(1-гидроксиэтил)пиридин-2-ил)этокси)бензил)тиазолидин-2,4-дион и его стереоизомеры имеют различную активность агонистов PPAR гамма, с диапазоном значений EC<sub>50</sub>. Эти данные показывают, что эти соединения активируют рецепторы PPAR-гамма и, следовательно, биологические функции, зависящие от этой активации.

### **Пример 3**

Общие условия эксперимента:

<sup>1</sup>H-спектры регистрировали на 400 МГц ЯМР-спектрометре Varian с использованием соответствующих дейтерированных растворителей. Хроматографические анализы соединений были проведены с использованием соответствующих способов, как показано ниже.

#### Способ LCMS

Колонка: Agilent Zorbax 3,5 мкм, SB-C8 (4,6 × 75 мм); длина волны: 210 нм; скорость потока: 1 мл/мин; время протока: 7 мин; Подвижная фаза-градиенте (t/%B): 0/30, 3,5/95, 5/95, 5,5/30, 7/30 [A: Вода (0,1% муравьиная кислота); B: Ацетонитрил]; MASS: Agilent-single quad-multimode-APCI-ESI.

#### Способ хиральной ВЭЖХ

Колонка: Chiralpak-IA 5 мкм (4,6 мм × 250 мм); длина волны: 210 нм; скорость потока: 0,7 мл/мин; время протока: 30

мин; Подвижная фаза-изократическая: 65/35 (А/В) [А: н-гексан (0,05% триэтиламина и 0,1% трифторуксусной кислоты), В: Изопропиловый спирт].

#### Способ хиральной преп-ВЭЖХ

Колонка: Chiralpak-IA 5 мкм (250 × 20мм); длина волны: 254 нм; скорость потока: 18 мл/ мин; время протока: 60 мин; Подвижная фаза-изократическая 50/50 (А/ В): А: н-гексан, В: этанол (0,05% триэтиламин).

#### Способ ВЭЖХ

Колонка: Symmetry Shield RP-18, 5 мкм (4,6×250 мм); длина волны: 210 нм; скорость потока: 1 мл/мин; время протока: 28 мин; подвижная фаза-градиент: (t/%В): 0/10, 8/10, 12/60, 16/80, 20/80, 24/10, 28/10 [А: Вода (калий первичный кислый о-фосфорнокислый (рН ~ 3)), В: Ацетонитрил]

**Пример 4:** 5-(4-(2-(5-(1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил) этокси) бензил) тиазолидин-2,4-дион (**1**) был подготовлен в соответствии со Схемой 6.

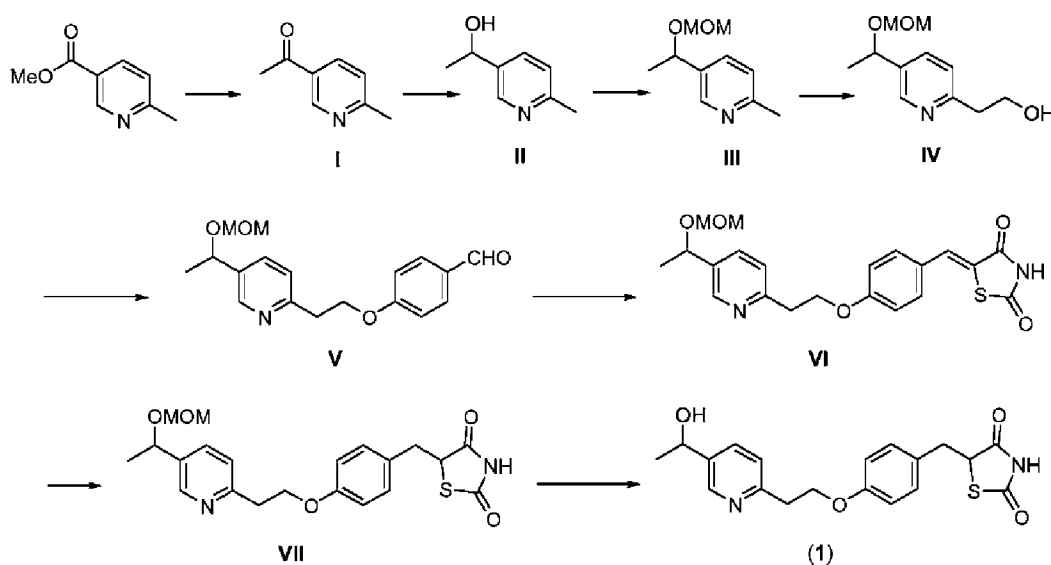


Схема 6

#### **1-(6-метилпиридин-3-ил)-этанол (II)**

LiHMDS (1,0 М в тетрагидрофуране, 463 мл, 0,463 моль) добавляли по каплям к охлажденному раствору метилового эфира 6-метилникотината (20 г, 0,132 моль) и этилацетата (82 г, 0,927 моль) в диметилформамиде при температуре  $-50^{\circ}\text{C}$ ; постепенно повышали температуру до к.т. и перемешивали при той же

температуре. Через 1 ч реакцию смесь охлаждали до 0°C; медленно разбавляли 20%-ной серной кислотой и нагревали с обратным холодильником. Через 4 ч реакцию смесь охлаждали до к.т. и далее до 0°C и подщелачивали с помощью карбоната калия. Реакционную среду разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом (3×50 мл). Объединенный органический экстракт высушивали над сульфатом натрия и концентрировали с получением неочищенного 1-(6-метилпиридин-3-ил)этан-1-она (соединение I) (20,0 г), которое было принято на следующей стадии без какой-либо очистки.

ES-МС[M + 1]<sup>+</sup>: 136,1

Боргидрид натрия (2,3 г, 0,06 моль) добавляли небольшими порциями в течение 30 мин к раствору соединения I (16,4 г, 0,121 моль) в этаноле (160 мл) при 0°C, и реакцию смесь перемешивали при той же температуре. Через 1 ч реакцию смесь разбавляли раствором бикарбоната натрия (насыщ) (2×200 мл) и экстрагировали дихлорметаном (2×500 мл). Объединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением бледно-желтого масла, которое очищали с помощью хроматографии на испарительной колонне (5% метанол/дихлорметан) с получением соединения II (17,0 г, выход 93% за 2 стадии) в виде бледно-желтого масла.

ES-МС[M + 1]<sup>+</sup>: 138,1

<sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,35 (d, J=2,0 Гц, 1H), 7,63 (dd, J=8,0, 2,4 Гц, 1H), 7,12 (d, J=8,0 Гц, 1H), 4,89 (q, J=6,5 Гц, 1H), 3,30 (br s, 1H), 2,50 (s, 3H), 1,48 (d, J=6.5 Hz, 3H)

#### **5-(1-метоксиметокси-этил)-2-метил-пиридин (III)**

Соединение II (15 г, 0,109 моль) добавляют, по каплям, к охлажденной суспензии гидрида натрия (6,56 г, 0,164 моль) в тетрагидрофуране (150 мл) и перемешивали при 0 °C. Через 30 мин хлорметилметилэфир (13,2 г, 0,164 моль) добавляли по каплям при перемешивании и поддерживая внутреннюю температуру около 0 °C. После того, как добавление было закончено, реакцию смесь перемешивали при той же температуре в течение 1 ч. Реакционную

смесь охлаждали ледяной холодной воде (80 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×50 мл). Объединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением масла оранжевого цвета, которое очищают с помощью колоночной флэш-хроматографии (1% метанол/дихлорметан) с получением соединения **III** (10,0 г, 51% выход) в виде бледно-желтого масла.

ES-МС [M+1]<sup>+</sup>: 182,2

<sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,45 (d, J=2,0 Гц, 1H), 7,56 (dd, J=8,0, 2,0 Гц, 1H), 7,14 (d, J=8,0 Гц, 1H), 4,75 (d, J=6,4 Гц, 1H), 4,57 (ABq, 2H), 3,36 (s, 3H), 2,53 (s, 3H), 1 0,48 (d, J=6,6 Гц, 3H)

#### **2-[5-(1-метоксиметокси-этил)пиридин-2-ил]-этанол (IV)**

Смесь соединения **III** (7,0 г, 0,0386 моль) и 37% раствор формальдегида (5,8 г, 0,077 моль) нагревали до 160°C в запаянной стеклянной трубке в течение 5 часов. Реакционную смесь охлаждали до к.т. и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного соединения, которое очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (1% метанол/дихлорметан) с получением соединения **IV** (1 0,2 г, выход 17%) в виде бледно-желтого масла.

ES-МС [M+1]<sup>+</sup>: 212,1

<sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,42 (d, J=2,0 Гц, 1H), 7,65 (dd, J=8,0, 2,4 Гц, 1H), 7,25 (d, J=8,0 Гц, 1H), 4,72 (d, J=6,6 Гц, 1H), 4,65 (t, J=5,6 Гц, 1H), 4,52 (ABq, 2H), 3,73 (m, 2H), 3,24 (s, 3H), 2,86 (t, J=7,2 Гц, 2H), 1,49 (d, J=6,4 Гц, 3H).

#### **4-{2-[5-(1-метоксиметокси-этил)пиридин-2-ил]-этокси} бензальдегид (V)**

Метансульфохлорид (1,19 г, 0,01 моль) добавляли по каплям к охлажденной суспензии соединения **IV** (1,7 г, 0,008 моль) и триэтиламина (1,79 мл, 0,013 моль) в дихлорметане (20 мл) при 0°C и перемешивали при той же температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь разбавляли водой (50 мл) и экстрагировали дихлорметаном (3×50 мл). Объединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали с

получением 2-(5-(1-(метоксиметокси)этил)пиридин-2-ил)этилметансульфоната (2,04 г, 88% выход) в виде желтого масла, которое принято на следующей стадии без очистки.

ES-МС[M+1]<sup>+</sup>: 290

2-(5-(1-(метоксиметокси)этил)пиридин-2-ил)этилметансульфонат добавляли (2,3 г, 0,008 моль) к перемешиваемой суспензии 4-гидроксибензальдегида (1,65 г, 0,0137 моль) и карбоната калия (1,86 г, 0,0137 моль) в смеси толуола (25 мл) и этанола (25 мл); перемешивали при 85°C в течение 5 часов. После истощения исходных материалов реакцию смесь разбавляли водой (30 мл) и экстрагировали этилацетатом (2×100 мл). Объединенный органический экстракт промывали водой; высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением неочищенной темно-желтой жидкости. Сырой продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (1% метанол/дихлорметан), получая соединение **V** (1,5 г, выход 60%) в виде бледно-желтой жидкости.

ES-МС[M+1]<sup>+</sup>: 316,1

**5-(4-{2-[5-(1-метоксиметокси-этил)пиридин-2-ил]этокси}бензилиден)-тиазолидин-2,4-дион (VI)**

Пиперидин (80 мг, 0,95 ммоль) добавляли к раствору соединения **V** (0,6 г, 1,9 ммоль) и тиазолидин-2,4-диона (0,22 г, 1,9 ммоль) в этаноле (15 мл), и смесь нагревали с обратным холодильником в течение ночи. Через 15 ч реакцию смесь охлаждали до к.т. и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенной смеси, которую очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (2% метанол/дихлорметан), получая соединение **VI** (500 мг, 64% выход) в виде желтого твердого вещества.

ES-МС[M+1]<sup>+</sup>: 415,1

<sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 12,25 (br s, 1H), 8,47 (d, J=2,0 Гц, 1H), 7,70 (dd, J=8,0, 2,0 Гц, 1H), 7,54 (d, J=8,8 Гц, 2H), 7,36 (d, J=8,0 Гц, 1H), 7,21 (d, J=8,8 Гц, 2H), 4,73 (m, 1H), 4,60-4,40 (m, 4H), 4,22 (t, J=6,2 Гц, 1H), 3,24 (s, 3H), 3,20 (t, J=6,8 Гц, 2H), 1,41 (d, J=6,0 Гц, 3H).

**5-(4-{2-[5-(1-гидрокси-этил) пиридин-2-ил] этокси} бензил) тиазолидин-2,4-дион (1)**

Раствор боргидрида натрия (115 мг, 3,017 ммоль) в 0,2 N растворе гидроксида натрия (1,2 мл) медленно добавляли к перемешиваемому раствору соединения **VI** (0,5 г, 1,207 ммоль), диметилглиоксима (42 мг, 0,36 ммоль) и  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (23 мг, 0,096 ммоль) в смеси воды (6 мл): тетрагидрофуран (6 мл) и 1M раствора гидроксида натрия (1 мл) при 10°C, и после добавления реакционную смесь перемешивали при к.т. Через 1ч цвет реакции светлел, и добавляли дополнительные количества боргидрида натрия (46 мг, 1,207 ммоль) и  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (22 мг, 0,096 ммоль), и перемешивание продолжали при комнатной температуре. Через 12 ч реакционную смесь нейтрализовали уксусной кислотой (pH ~ 7); разбавляли водой (10 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×50 мл). Объединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали, получая неочищенное соединение **VII**, 5-(4-(2-(5-(1-(метоксиметокси)этил) пиридин-2-ил) этокси) бензил) тиазолидин-2,4-диона (0,4 г) в виде бледно-желтого полутвердого вещества, которое было принято на следующей стадии без очистки.

ES-МС [M+1]<sup>+</sup>: 417,5

2N HCl (2 мл) добавляли к раствору соединения **VII** (0,4 г, 0,96 ммоль) в метаноле (20 мл) и полученную смесь нагревали с обратным холодильником. Через 4 ч реакционную смесь охлаждали до к.т.; концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, который растворяли в воде, и полученный раствор нейтрализовали с использованием раствора бикарбоната натрия (насыщ). Полученный белый осадок собирали фильтрацией, получая соединение **1** (250 мг, выход 56% за 2 стадии) в виде не совсем белого твердого вещества.

ES-МС [M+1]<sup>+</sup>: 373,4

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 12,00 (br s, -NH), 8,46 (d, J=2,0 Гц, 1H), 7,66 (dd, J=8,0, 2,4 Гц, 1H), 7,30 (d, J=8,0 Гц, 1H), 7,13 (d, J=8,4 Гц, 2H), 6,86 (d, J=8,4 Гц, 2H), 5,25 (d, J=4,4 Гц, 1H), 4,86 (m, 1H), 4,75 (m, 1H), 4,30 (t, J=6,8



Гц, 2H), 3,30 (m, 1H), 3,14 (t, J=6,4 Гц, 2H), 3,04 (m, 1H), 1,34 (d, J=6,4 Гц, 3H).

**Пример 5** (смесь (с) соединений (2) и (4)) и (смесь (с) соединений (3) и (4))

Смесь соединений (2) и (4) (смесь (с)) и смесь соединений (3) и (5) (смесь (d)) получали в соответствии со схемой 7.

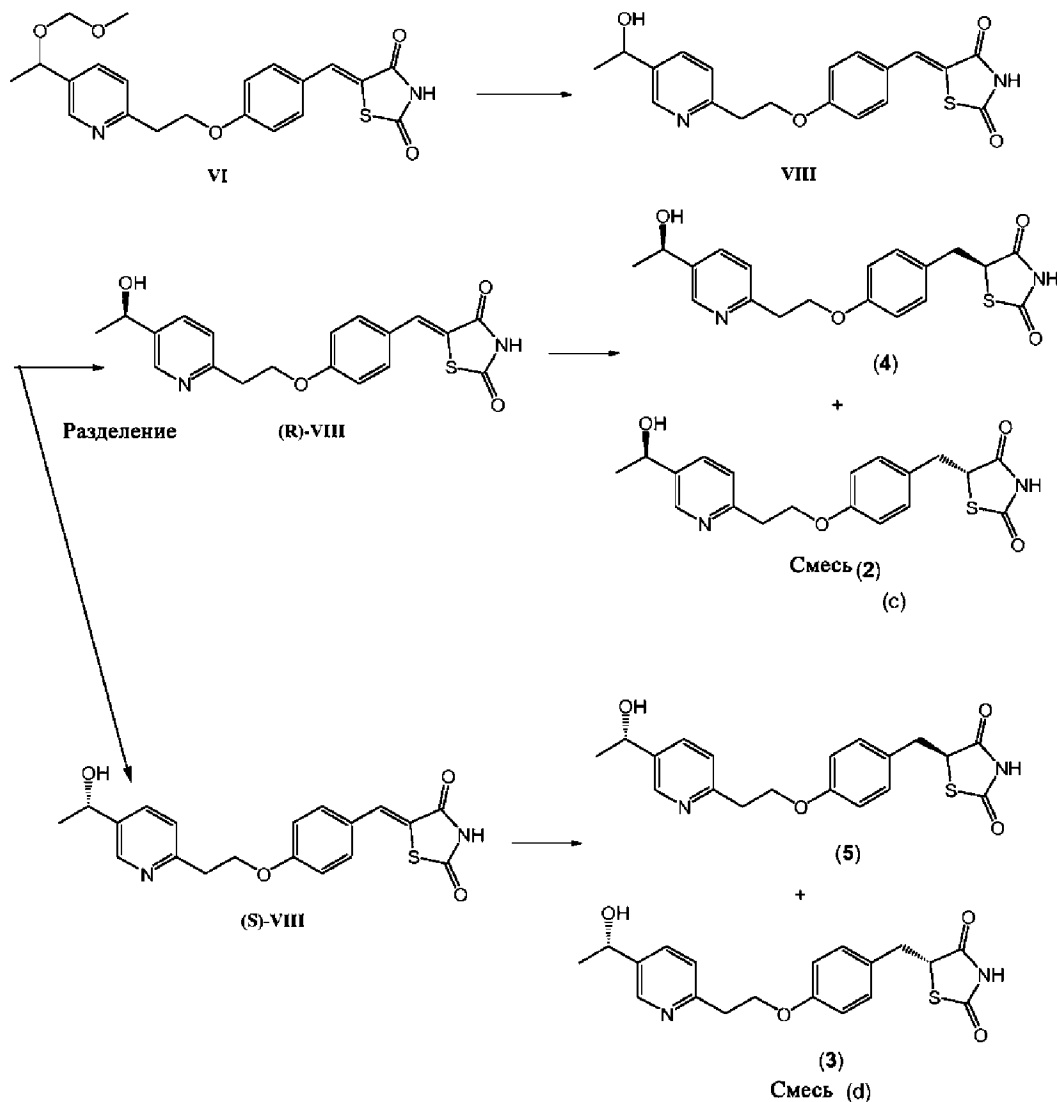


Схема 7

Метилхлорметилэфирную группу (Z)-5-(4-(2-(5-(1-(метоксиметокси)этил)пиридин-2-ил)этокси)бензилиден)тиазолидин-2,4-диона (соединение VI) удаляли путем обработки водным раствором HCl с получением рацемического спирта VIII.

Энантиомеры, содержащиеся в рацемической смеси (Z)-5-(4-(2-(5-(1-гидроксиэтил)пиридин-2-ил)этокси)бензилиден)тиазолидин-2,4-диона (VIII) разделяли с помощью хиральной ВЭЖХ хроматографии с получением (R)-VIII и

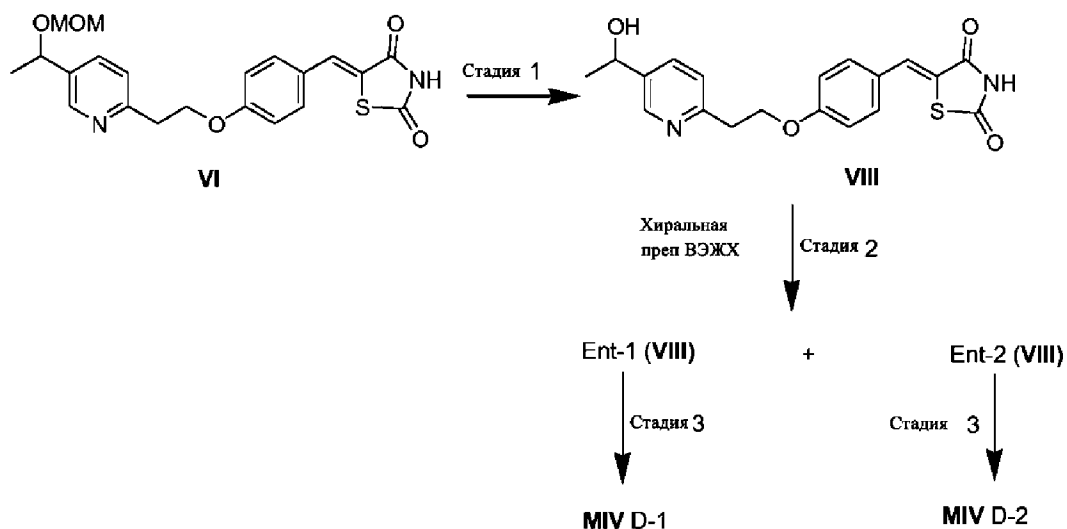
(S)-VIII.

(R)-VIII затем обрабатывали восстанавливающей смесью ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , диметилглиоксим,  $\text{NaOH}$ , боргидрид натрия), (модифицированный протокол Pfaltz восстановления конъюгата), с получением смеси (c), содержащей соединения (2) и (4).

(S)-VIII затем обрабатывали восстанавливающей смесью ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , диметилглиоксим,  $\text{NaOH}$ , боргидрид натрия), (модифицированный протокол Pfaltz восстановления конъюгата), с получением смеси (d), содержащей соединения (3) и (5).

**Пример 6:** Получение диастереомерных смесей D-1 и D-2 M-IV:

**Схема 1:**



**Стадия 1: Синтез соединения VIII:**  $\text{HCl}$  (48 мл, 2Н) добавляют к раствору соединения VI (10 г, 0,024 моля) в метаноле (200 мл), и полученную смесь нагревали с обратным холодильником. После 4 ч с обратным холодильником реакционную смесь охлаждали до к.т. и концентрировали при пониженном давлении с получением желтого твердого вещества. Твердое вещество суспендировали в воде (70 мл) и нейтрализовали с помощью насыщенного раствора  $\text{NaHCO}_3$ . Полученный бледно-желтый осадок собирали фильтрацией и сушили в вакууме с получением соединения VIII (7,5 г, выход 84%).

ES-МС  $[\text{M}+1]^+$ : 371,0.

**Стадия 1: Хиральная преп. ВЭЖХ**

Соединение VIII (1,0 г) растворяли в смеси, содержащей равные объемы ацетонитрила, метанола и дихлорметана;

впрыскивали (150 мкл инъекции) в хиральную колонку преп-ВЭЖХ (Chiralpak-IA 250×20 мм, 5 мкм) и разделяли [подвижная фаза н-гексан/0,05% Et<sub>3</sub>N в EtOH (50:50); скорость потока: 18 мл/мин; время тока: 60 мин]. Фракции, содержащие энантиомеры VIIIa и VIIIb, по отдельности концентрировали при пониженном давлении до минимального объема, и соответствующие остатки разбавляли EtOAc (100 мл), а затем водой (50 мл). Полученные органические фазы высушивали над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали с получением соединений VIIIa и VIIIb в виде не совсем белого твердого вещества. Энантиомеры VIIIa и VIIIb были выделены, но абсолютная конфигурация каждого энантиомера не была определена.

**Соединение Ent-1 (VIII):** 250 мг (выход: 50%);  $t_R$  (хиральная ВЭЖХ)=14,8 мин; ES-МС [M+1]<sup>+</sup>: 371,0; <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d 6): δ 12,5 (br s, 1H), 8,47 (s, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,67 (dd, J=8,0, 2,0 Гц, 1H), 7,53 (d, J=9,2 Гц, 2H), 7,31 (d, J=7,6 Гц, 1H), 7,08 (d, J=8,8 Гц, 2H), 5,25 (d, J=4,0 Гц, 1H), 4,74-4,76 (m, 1H), 4,43 (dd, J=6,8, 6,4 Гц, 2H), 3,18 (t, J=6,4 Гц, 2H), 1,34 (d, J=6,4 Гц, 3H).

**Соединение Ent-2 (VIII):** 237 мг (выход: 47%);  $t_R$  (хиральная ВЭЖХ)=16,7 мин; ES-МС [M+1]<sup>+</sup>: 371,0; <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d 6): δ 12,5 (br s, 1H), 8,47 (s, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,67 (dd, J=8,0, 2,0 Гц, 1H), 7,53 (d, J=8,8 Гц, 2H), 7,31 (d, J=8,0 Гц, 1H), 7,08 (d, J=9,2 Гц, 2H), 5,23 (d, J=3,6 Гц, 1H), 4,75 (m, 1H), 4,43 (dd, J=6,8, 6,4 Гц, 2H), 3,18 (dd, J=6,8, 6,4 Гц, 2H), 1,34 (d, J=6,4 Гц, 3H).

#### **Синтез диастереомерных смесей M-IV**

##### **Синтез D-1 MIV**

**Стадия 3:** Раствор NaBH<sub>4</sub> (77 мг, 2,02 ммоль) в 0,1н NaOH (2 мл) медленно добавляли к перемешиваемому раствору соединения **Ent-1 (VIII)** (250 мг, 0,675 ммоль), диметилглиоксима (32 мг, 0,27 ммоль) и CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (16 мг, 0,067 ммоль) в смеси воды (10 мл), ТГФ (10 мл) и раствора 1М NaOH (0,5 мл) при 10°C, и реакционную смесь перемешивают обесцветилась при RT в течение 1 ч. После того, как реакционная среда обесцветилась, добавляли дополнительное количество NaBH<sub>4</sub> (26 мг, 0,675 ммоль) и

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (16 мг, 0,067 ммоль) и перемешивание продолжали при комнатной температуре [Дополнительные количества  $\text{CoCl}_2$  и  $\text{NaBH}_4$  добавляли с 12ч интервалами, пока исходное вещество не иссякнет, что контролируют с помощью LCMS]. Через 90–96 ч реакцию смесь нейтрализовали уксусной кислотой (pH ~ 7); разбавляли водой (10 мл) и экстрагировали в EtOAc (3×50 мл). Объединенный органический экстракт высушивали над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрировали, получая неочищенное соединение, которое очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии ( $\text{SiO}_2$ , 4% метанол в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) с получением диастереомерной смеси **MIV D-1** (125 мг) в виде не совсем белого твердого вещества.

#### **Синтез D-2 MIV**

**Стадия 3:** Раствор  $\text{NaBH}_4$  (72 мг, 1,921 ммоль) в 0,1н NaOH (2 мл) медленно добавляли к перемешиваемому раствору соединения **Ent-2 (VIII)**, (237 мг, 0,64 ммоль), диметилглиоксима (30 мг, 0,256 ммоль) и  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (15 мг, 0,064 ммоль) в смеси воды (10 мл), ТГФ (10 мл), и раствора 1М NaOH (0,5 мл) при 10 °С, и реакцию смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. После того, как реакционная среда обесцветилась, добавляли дополнительное количество  $\text{NaBH}_4$  (24 мг, 0,64 ммоль) и  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (15 мг, 0,064 ммоль), и перемешивание продолжали при комнатной температуре [Дополнительные количества  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{NaBH}_4$  добавляли с 12ч интервалами, пока исходное вещество не истощится, что контролировали с помощью LCMS]. Через 96 ч реакцию смесь нейтрализовали уксусной кислотой (pH ~ 7); разбавляли водой (10 мл) и экстрагировали в EtOAc (3×50 мл). Объединенный органический экстракт высушивали над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрировали, получая неочищенное соединение, которое очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии ( $\text{SiO}_2$ , 4% метанол в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) с получением диастереомерной смеси **MIV D-2** (100 мг) в виде не совсем белого твердого вещества.

**MIV D-1:** выход: 125 мг (50%);  $t_R$  (хиральная ВЭЖХ)=17,8, 14,7 мин; ES-МС  $[\text{M}+1]^+$ : 373,0,  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  12,00 (br s, NH), 8,46 (d,  $J=2,0$  Гц, 1H), 7,67 (dd,  $J=8,0, 2,4$  Гц, 1H), 7,30 (d,  $J=8,0$  Гц, 1H), 7,13 (d,  $J=8,8$  Гц, 2H), 6,86

(d, J=8,4 Гц, 2H), 5,27 (d, J=4,0 Гц, 1H), 4,88-4,85 (m, 1H), 4,76-4,74 (m, 1H), 4,30 (t, J=6,8 Гц, 2H), 3,30 (m, 1H), 3,14 (dd, J=6,8, 6,4 Гц, 2H), 3,08-3,02 (m, 1H), 1,34 (d, J=6,4 Гц, 3H).

**MIV D-2:** Выход: 100 мг (42%);  $t_R$  (хиральная ВЭЖХ)=19,4, 16,5 мин; ES-МС [M+1]<sup>+</sup>: 373,0; <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d 6): δ 12,01 (br s, -NH), (d, J=2,0 Гц, 1H), 7,67 (dd, J=8,0, 2,0 Гц, 1H), 7,31 (d, J=8,0 Гц, 1H), 7,13 (d, J=8,8 Гц, 2H), 6,86 (d, J=8,8 Гц, 2H), 5,27 (d, J=4,0 Гц, 1H), 4,88-4,85 (m, 1H), 4,76-4,74 (m, 1H), 4,30 (dd, J=6,8, 6,4 Гц, 2H), 3,30 (m, 1H), 3,14 (dd, J=6,8, 6,4 Гц, 2H), 3,08-3,02 (m, 1H), 1,34 (d, J=6,8 Гц, 3H).

Смеси диастереомеров D-1 и D-2 MIV соответствуют смесям (c) и (d), описанным выше, но конкретные диастереомеры, присутствующие в каждой смеси диастереомеров, не были определены.

**Пример 7:** *in vitro* ADME и токсикологическая характеристика

Протокол: проведенные анализы включают ингибирование цитохрома P450 различными изоформами, микросомальную и гепатоцитную стабильность, нейротоксичность в нервных клетках и анализы безопасности hERG при помощи электрофизиологического измерения фиксации потенциала (FDA Draft Guidance for Industry. Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labelling Recommendations 2012, The European Medicines Agency (EMA) Guideline on the Investigation of Drug Interactions Adopted in 2012, Schroeder K *et al.* 2003 J Biomol Screen 8 (1); 50-64, Barter ZE *et al.* 2007 Curr Drug Metab 8 (1); 33-45, LeCluyse EL and Alexandre E 2010 *Methods Mol Biol* 640; 57-82). Результаты показывают безопасный и благоприятный профиль ADME для соединений по настоящему изобретению.

**Пример 8:** Отношения плазма-мозга пиоглитазона, MIV, MIII и MII после перорального дозирования однократного введения пиоглитазона при 4,5 мг/кг самцам мышей C57BL/6.

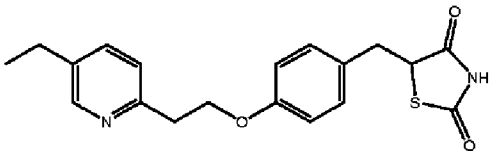
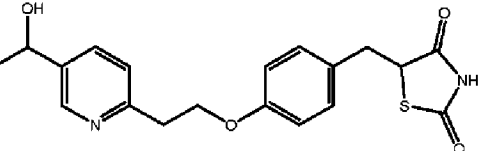
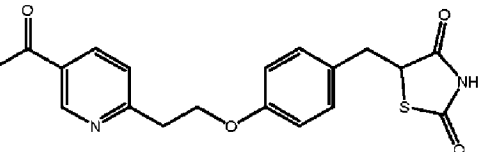
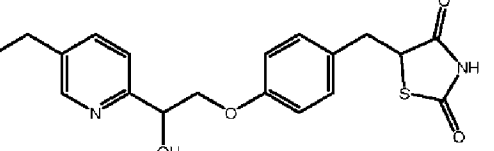
Отношения мозг-плазма рассчитывали на основе уровней

пиоглитазона, MIV, MIII и MII в плазме и мозге, количественно определенных при  $C_{max}$  (максимальная концентрация) после перорального приема однократного введения пиоглитазона при 4,5 мг/кг самцам мышей C57BL/6.

Процентное отношение мозга-плазма составляло 9, 13, 7 и 1%, соответственно, для пиоглитазона, MIII и MII, как показано на Фигуре 4. Таким образом, активные метаболиты MII и MIII преодолевали ГЭБ в значительно меньшей степени, чем пиоглитазон, как это было предсказано на основании физико-химических свойств соединений (см. Таблицу 1). В отличие от этого, метаболит MIV неожиданно преодолевал ГЭБ с более высоким процентным отношением, чем исходное соединение пиоглитазона.

Расчеты обоих индексов (ClogP и QPlogBB) для пиоглитазона и его метаболитов MII и MIII приведены в таблице 1. Для обоих индексов 2 метаболита являются более низкими, чем для пиоглитазона, что предлагает для MII и MIII менее преимущественное проникновение и распределение внутри ЦНС.

ТАБЛИЦА 1

Структура	Название	QPlogBB	ClogP	HBD	HBA
	Пиоглитазон	-1,22	3,53	1	4
	MIV	-1,72	1,78	2	5
	MIII	-1,66	2,34	1	5
	MII	-1,72	2,13	2	5

Пример 9: соотношения плазма-мозг пиоглитазона и MIV и последующее пероральное дозирование однократного введения либо пиоглитазона, либо M-IV при 4,5 мг/кг для каждого самцам мышей

C57BL/6.

Для подтверждения результатов, показанных в последнем примере, были проведены дополнительные эксперименты. Соотношение мозг-плазма рассчитывали на основе фармакокинетических кривых профилей концентрация-время в плазме и мозге, рассчитанных как площадь под кривыми пиоглитазона и после перорального дозирования однократного введения либо пиоглитазона, либо MIV при 4,5 мг/кг для каждого самца мышей C57BL/6.

Процентное соотношение мозг-плазма составило 8% и 12% для пиоглитазона и M4, соответственно, как показано на Фигуре 5. Это 50% увеличение в соотношении мозг-плазма для гидроксированного метаболита M-IV по сравнению с тем, которое наблюдается для пиоглитазона при тех же условиях, было совершенно неожиданно из прогнозных расчетов на основе физико-химических свойств (см. Таблицу 1).

M-IV показывает поведение, противоположным ожидаемому. Как и MII, MIV является моногидроксированным метаболитом, но вместо уменьшения на около 50% его проникновения ГЭБ, проникновение ГЭБ было на 50% выше.

Расчеты обоих индексов (ClogP и QPlogBB) для пиоглитазона и M-IV представлены в таблице 1. Для обоих индексов MIV показывает меньшее значение, чем пиоглитазон, что позволяет предположить, что для M-IV менее преимущественное проникновение и распределение внутри ЦНС, вопреки тому, что неожиданно было обнаружено экспериментально.

**Пример 10:** Определение эпимеризации *in vivo* двух диастереомерных смесей MIV, D-1 и D-2, на мышах.

Протокол: Были определены фармакокинетические параметры диастереомерных смесей D-1 и D-2 5-(4-(2-(5-(1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил) этокси) бензил) тиазолидин-2,4-диона после однократного перорального введения через зонд дозы (4,5 мг/кг) самцам швейцарских мышей-альбиносов. В общей сложности 51 мышь были использованы в этом исследовании с параллельным дизайном выборки (n=3/временная точка). Образцы крови собирали перед дозированием и различное время после введения дозы для

обеих пероральных фармакокинетик.

Смеси диастереомеров D-1 и D-2 5-(4-(2-(5-(1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил) этокси) бензил) тиазолидин-2,4-диона экстрагировали из образцов плазмы швейцарской мышей-альбиносов с использованием способа жидкостно-жидкостной экстракции (LLE) и количественно определяли с помощью жидкостной хроматографии, тандемно совмещенной с масс-спектрометрией (LC-MS/MS) с электро-спрейной ионизацией (ESI) и мониторингом нескольких реакций (MRM). Отобранные образцы плазмы и мозга были подвергнуты хиральному анализу с использованием хиральной колонки AGP для идентификации хирального интер-преобразования. Ахиральный биоаналитический способ был использован для количественного определения общего M-IV, присутствующего в образцах плазмы и мозга.

Образцы составов соответствующим образом разбавляли 70%-ным метанолом и приборный ответ сравнивали с известными соответствующими диастереомерными стандартными смесями с использованием ахирального способа LC-MS/MS. Нижний предел количественного определения (LLOQ) в плазме для диастереомерной смеси D-1 и D-2 5-(4-(2-(5-(1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил) этокси) бензил) тиазолидин-2,4-диона (**1**) составляет 0,99 нг/мл. Фармакокинетические параметры были рассчитаны с использованием средств не-блочного анализа Phoenix WinNonlin.

Результаты этих экспериментов представлены на фиг.6. Данные ясно показывают, что разница в % превращения среди диастереомерных смесей у мышей является высокой. *In vivo* как D-1, так и D-2 взаимопревращаться, хотя превращение в D-2 из D-1 является гораздо более акцентированным, чем превращение из D-1 в D-2.

**Пример 11:** Характеристика поврежденных глутаматом кортикальных нейронов в качестве модели болезни Альцгеймера.

Первичные нейроны коры головного мозга, поврежденные глутаматом (эксайтотоксичность), являются хорошо зарекомендовавшей себя *in vitro* моделью нейродегенеративных расстройств (*J Neurosci*; 1999 Apr 1;19(7):2455-63; *J Neurosci Res*. 2013 May;91(5):706-16), таких как болезнь Паркинсона,



болезнь Альцгеймера и болезнь Хантингтона (*Brain Res Bull* 2013 Apr;93:27-31.), но и других патологий, таких как рассеянный склероз (*Scand J Immunol* 2014; 79(3):181-186).

Протокол: Кортикальные нейроны крысы культивировали, как описано у Singer (*J Neurosci.* 1999 Apr 1;19(7):2455-63) и Callizot (*J Neurosci Res.* 2013 May;91(5):706-16).

Эмбрионы собирали и сразу же помещали в охлажденную во льду среду Лейбовица. Кору головного мозга обрабатывали раствором трипсина-ЭДТА, и диссоциацию останавливали добавлением Dulbecco's модифицированной среды Игла (DMEM) с глюкозой (Pan Biotech), содержащей ДНКазу I и 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS). Клетки механически разъединяли и центрифугировали. Осадок ресуспендировали в определенной культуральной среде с нейротрофическим фактором мозга (BDNF) в концентрации 10 нг/мл.

Клетки высевали в 96-луночные планшеты, предварительно покрытые поли-L-лизинном, и культивировали при 37°C. Среду меняли каждые 2 дня. Кортикальные нейроны подвергали интоксикации глутаматом через 13 дней культивирования.

Если коротко, то на 13-й день культивирования BDNF и исследуемое соединение предварительно инкубировали с первичными кортикальными нейронами в течение 1 ч перед воздействием глутамата. Глутамат добавляли до конечной концентрации 40 мкМ, разведенный в контрольной среде в присутствии BDNF или тестируемого соединения, в течение 20 мин.

Через 20 мин глутамат вымывали, и свежая культуральная среда с BDNF или тестируемым соединением добавляли в течение дополнительных 48 часов. Оценку выживаемости проводили с помощью МТТ-анализа выполненного с использованием CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega).

Результаты представлены на фиг.7. Они демонстрируют, что при повреждении глутаматом MIV (соединение (1)) показывает защитный эффект (достижение значения для 3 мкМ). Интересно, что для MIV мы наблюдали красивую кривую в форме колокола. При 3 мкМ мы имеем полный защитный эффект, какой наблюдается при

использовании эталонного соединения (BDNF, 50 нг/мл). Все величины выражены как среднее значение +/- среднеквадратическая ошибка. Статистический анализ проводился с помощью одностороннего ANOVA с последующим тестом Даннетта или PLSD-тестом Фишера,  $p < 0,05$  считаются значимыми.

**Пример 12:** Определение ингибирования MAO В (моноаминоксидазы) в качестве потенциального лекарственного средства для лечения болезни Паркинсона.

Селективные ингибиторы MAO-B увеличивают уровни дофамина в ЦНС, пострадавшей при болезни Паркинсона без увеличения уровня других нейромедиаторов (адреналина, норадреналина и серотонина), в отличие неселективных ингибиторов MAO (MAO-A и MAO В). Ингибиторы MAO-B могут быть использованы также для лечения депрессий.

Протокол: рекомбинантные белки моноаминоксидаз MAO-A и MAO-B человека были приобретены у Sigma Aldrich (ссылка M7316 и M7441, соответственно). Для отслеживания ферментативной активности MAO и скорости ее ингибирования использовали анализа на основе флуоресценции. Субстрат для анализа, кунарамин, не является флуоресцентным до прохождения окислительного дезаминирования при помощи MAO, что приводит к образованию флуоресцирующего продукта 4-оксихинолина. Кунарамин является субстратом как для MAO-A, так и MAO-B (неспецифический субстрат). Клоргилин и депренил (Sigma Aldrich) использовали в качестве контроля для специфического ингибирования MAO-A и MAO-B, соответственно.

Результаты показывают, что 5-(4-(2-(5-(1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил) этокси) бензил) тиазолидин-2,4-дион ингибирует MAO-B с  $IC_{50}$ , составляющей 70,5 нМ. В отличие от этого, данное соединение не ингибирует белок MAO-A.

**Пример 13:** Характеристика эффективности *in vivo* на животных моделях экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита (ЕАЕ) как модели нейровоспалительных заболеваний.

Нейровоспаление может быть инициировано в ответ на различные инфекции, черепно-мозговой травмы, токсические

вещества или аутоиммунные реакции в центральной нервной системе.

Модели нейровоспаления, характеризующиеся пролиферацией астроцитов и микроглии, наряду с потерей нейронов, являются характерной особенностью многих заболеваний центральной нервной системы, включая болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, инсульт, болезнь Паркинсона, черепно-мозговую травму, инфекцию и ALD (Human Molecular Genetics, 2004, Vol. 13, No. 23 2997-3006).

Хроническое воспаление представляет собой замедленную активацию глиальных клеток и привлечение других иммунных клеток в головном мозге. Это хроническое воспаление, которое обычно ассоциируется с нейродегенеративными заболеваниями.

Модель ЕАЕ представляет собой модель нейровоспаления, классически используемую для рассеянного склероза, который напоминает и включает в себя большинство особенностей тяжелых церебральных форм ALD, активации микроглии, демиелинизации мозга, а также дегенерации аксонов. Хотя этиология заболевания отличается от ALD и ЕАЕ (модель рассеянного склероза вызвана аутореактивного CD4+лимфоцитов), модель ЕАЕ является ценным инструментом для изучения способов лечения как ALD, так и рассеянного склероза (Nature 2007; 7: 904- 912).

Протокол: Развитие клинических симптомов при рассеянном склерозе и его модели экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ) на животных включает активацию Т-клеток и их миграцию в центральную нервную систему, продуцирование глиальных производных воспалительных молекул и демиелинизацию и повреждение аксонов. Хронический, монофазный ЕАЕ активно индуцировался, как описано, синтетическим пептидом миелинового олигодендроцитного гликопротеина 35-55 (MOG35-55, MEVGVYRSPFSRWHLRNGK, SEQ ID NO: 1) с чистотой выше 98%. Самкам мышей C57BL/6 (6-8 недельным) вводили (две 100 мкл подкожные инъекции в одну заднюю конечность) 250 мкг MOG35-55, эмульгированного забуференного фосфатом растворе, смешанного с 100 мкл полного адъюванта Фрейнда, содержащего 500 мкг *Mycobacterium tuberculosis* (Difco, Detroit, MI). Мыши получали

инъекцию коклюшного токсина (400 нг в 200 мкл забуференного фосфатом растворе, внутривенно), вторую инъекцию коклюшного токсина через 2 дня и бустер-инъекцию MOG35-55 через 7 дней. Клинические признаки оценивали следующим образом: 0, никаких признаков; 1,0, дряблый хвост/потеря прямооты; 2,0, атаксия с дряблым хвостом; 3,0, паралич одной задней конечности; 4,0, паралич обеих задних конечностей; 4,5, агонирование; и 5,0, смерть. Для обеих моделей отмечали оценки по 5-балльной шкале и подсчитывали только в день смерти. Соединение вводили дважды в день (ставка), начиная с 5-го дня после иммунизации в течение 15 дней в трех различных возрастающих дозах.

Результаты показали, что MIV (соединение (1)) снижает развитие и тяжесть в модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита. Средние ежедневные клинические показатели из эксперимента показаны на фиг.9. Клинические симптомы уменьшаются дозо-зависимым образом, самые высокие дозы показывают максимальный эффект. Клинические симптомы были снижены при помощи MIV, что подтверждает роль активации PPAR-гамма в защитных эффектах. С лечением не были связаны потеря массы тела и какая-либо существенная гематологическая токсичность.

Нейровоспаление является отличительной чертой как рассеянного склероза, так и ALD, поэтому MIV может быть эффективным при обоих заболеваниях. В самом деле, снижение активации микроглии предоставляет молекулярную основу для объяснения, почему аллогенные и аутологичные HSCT эффективны при подавлении мозгового воспаления, а именно, путем замены и функционального метаболического восстановления линии моноцитов и связи фенотипов sALD и AMN с общим патогенным путем (Human Molecular Genetics, 2012, Vol. 21, No. 5 1062-1077). Таким образом, эти модели могут иметь большой потенциал и актуальность для изучения роли агонистов PPAR-гамма в ALD.

**Пример 14:** Характеристика фибробластов от пациентов X-ALD в качестве модели X-связанной адренолейкодистрофии.

Контрольные фибробласты и фибробласты с X-хромосомой адренолейкодистрофией человека были получены от Coriell

(Candem, США). Клетки выращивали в Дульбекко-модифицированной среде Eagle, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 ед/мл пенициллина и 100 мг стрептомицина, при 37°C в атмосфере 95% увлажненного воздуха/5% CO<sub>2</sub> до 80-90% слияния. Для выполнения наших экспериментов была использована Дульбекко-модифицированная среда Игла без D-глюкозы, пирувата или L-глутамина. Клетки культивировали в этой среде, дополненной 1 г/л глюкозы или 1 г/л галактозы и 10% фетальной бычьей сыворотки, в течение 24 ч инкубировали с возрастающими дозами MIV (3, 10 и 30 мкМ).

Определение МТТ проводили, как описано в Mosmann J. *Immunol. Methods* 1983, 65, 55-63 и Hansen J. *Immunol. Methods* 1989; 119, 203-210. Этот способ основан на способности жизнеспособных, но не мертвых клеток превращать соль тетразолия (МТТ) в окрашенный формазан.

Для определения уровней АТФ, 2×10<sup>4</sup> клеток/лунку засеивали в 96-луночный планшет для культивирования в полной среде. Через 16-18 ч клетки лизировали в 20 мкл буфера для лизиса, и 10 мкл лизата используют для измерения уровней АТФ с использованием набора для определения АТФ (Molecular Probes, Invitrogen). 1 мкл каждого из оставшихся лизатов использовали для определения белка.

Результаты показывают, что защитный эффект MIV (соединение (1)) на ALD-фибробласты был основан на увеличении выживаемости клеток (20% при 3 мкМ, vs необработанных).

**Пример 15:** Характеристика двигательных нейронов спинного мозга как модели заболеваний двигательных нейронов (ALS)

Двигательные нейроны спинного мозга, поврежденные глутаматом, представляют собой *in vitro* экспериментальную модель, подходящую для изучения ALS и других заболеваний двигательных нейронов (MND), таких как прогрессирующий бульбарный паралич, псевдобульбарный паралич, первичный боковой склероз (PLS), прогрессирующая мышечная атрофия, спинальная мышечная атрофия (SMA), постполиомиелитный синдром (PPS) и другие редкие заболевания, такие как болезнь Шарко-Мари-Тута,

синдром Гийена-Барре или AMN (*Neuron*. 1992 Apr;8(4):737-44).

Протокол: Двигательные нейроны спинного мозга (SC) крысы культивировали, как описано Martinou (*Neuron*. 1992 Apr;8(4):737-44) и Wang (*PLoS Genet*. 2013;9(9)). В кратком изложении, беременных самок крыс после 14 дней беременности забивали цервикальной дислокацией, а зародыши собирали и сразу же помещали в охлажденную в ледяной воде среду L15 Лейбовица. Спинной мозг обрабатывали в течение 20 мин при 37°C трипсином-ЭДТА. Диссоциацию останавливали добавлением Дульбекко модифицированной среды Игла (DMEM) с глюкозой (Pan Biotech), содержащий ДНКазу I и 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS). Клетки механически разъединяли, а затем центрифугировали. Осадок ресуспендировали в определенной культуральной среде при концентрации 10 нг/мл полученного из мозга нейротрофического фактора (BDNF). Клетки засеивали в 96-луночные планшеты, предварительно покрытые поли-L-лизинном, и культивировали при 37° C. Среду меняли каждые 2 дня.

Если коротко, на 13-й день культивирования BDNF или испытываемое соединение предварительно инкубировали с первичными двигательными нейронами спинного мозга (SC) в течение 1 ч до воздействия глутамата. Глутамат добавляли разведенным в контрольной среде до конечной концентрации 10 мкМ в присутствии BDNF или тестируемого соединения в течение 20 мин. Через 20 мин, глутамат вымывали, и добавляли свежую культуральную среду с BDNF или тестируемым соединением в течение дополнительных 48 часов.

Оценку выживаемости проводили иммунным окрашиванием. Через 48ч после интоксикации супернатант клеточной культуры отбирали и моторные нейроны SC фиксировали холодным раствором этанола (95%) и уксусной кислоты (5%) в течение 5 мин и пермеализировали. Клетки инкубировали в течение 2-х часов с моноклональным антителом против ассоциированного с микротрубочками белка 2 (MAP-2), которое специфически окрашивало клеточные тела нейронов (MAP-2), что позволяло проводить оценку выживаемости нейронов в культуре. Это антитело

детектировали Alexa Fluor 488 козьим анти-мышиным IgG).

Для каждого условия оценивали 6 лунок, получали 30 фотографий на лунку с использованием ImageXpress (Molecular Device) с 20-кратным увеличением. Все снимки были сделаны в одних и тех же условиях. Анализ общего числа нейронов осуществляли автоматически с помощью модульного редактора Custom (Molecular Device).

Тестируемые соединения предварительно инкубировали в течение 1 ч перед применением глутамата.

Результаты (фиг 10) показали, что MIV (соединение **(1)**, 1 мкМ) оказывает защитное действие двигательных нейронов (MN) SC от повреждения глутаматом, о чем свидетельствует статистически различное ( $p < 0,05$  t Стьюдента) увеличение выживаемости клеток vs контроля с глутаматом (Glut).

Список последовательностей

<110> MINORYX THERAPEUTICS S.L.

<120> Производные 2,4-тиазолидиндиона в лечении расстройств центральной нервной системы

<130> P10708PC00

<150> EP14382130.4

<151> 2014-04-02

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид миелинового олигодендроцитного гликопротеина 35-55

<400> 1

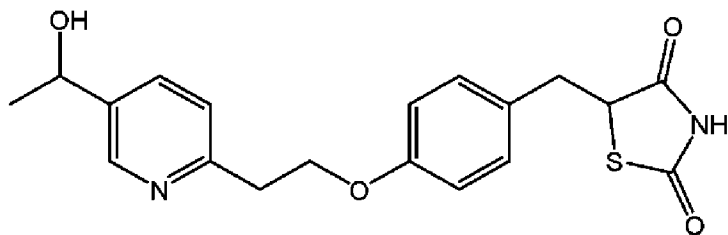
Met Glu Val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu  
1                    5                    10                    15

Tyr Arg Asn Gly Lys  
                  20



**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Соединение с формулой (1) или его фармацевтически приемлемая соль для лечения или профилактики расстройств центральной нервной системы



(1).

2. Соединение с формулой (1), выбранное из соединений с (2) по (5):

(2) (R)-5-(4-(2-(5-((R)-1-гидроксиэтил)пиридин-2-ил)этоксид)бензил)тиазолидин-2,4-дион

(3) (R)-5-(4-(2-(5-((S)-1-гидроксиэтил)пиридин-2-ил)этоксид)бензил)тиазолидин-2,4-дион

(4) (S)-5-(4-(2-(5-((R)-1-гидроксиэтил)пиридин-2-ил)этоксид)бензил)тиазолидин-2,4-дион

(5) (S)-5-(4-(2-(5-((S)-1-гидроксиэтил)пиридин-2-ил)этоксид)бензил)тиазолидин-2,4-дион

или фармацевтически приемлемой соли этого.

3. Соединение по п.2, в котором не более 1% от общего числа атомов водорода на моль соединения находятся в виде изотопа  $^2\text{H}$ .

4. Соединение для применения по п.1, выбранное из соединений с (2) по (5):

(2) (R)-5-(4-(2-(5-((R)-1-гидроксиэтил)пиридин-2-ил)этоксид)бензил)тиазолидин-2,4-дион

(3) (R)-5-(4-(2-(5-((S)-1-гидроксиэтил)пиридин-2-ил)этоксид)бензил)тиазолидин-2,4-дион

(4) (S)-5-(4-(2-(5-((R)-1-гидроксиэтил)пиридин-2-ил)этоксид)бензил)тиазолидин-2,4-дион

(5) (S)-5-(4-(2-(5-((S)-1-гидроксиэтил)пиридин-2-ил)этоксид)бензил)тиазолидин-2,4-дион

или фармацевтически приемлемой соли этого.

5. Смесь одного или нескольких соединений, определенных в

пункте 4, для применения в лечении или профилактике заболеваний центральной нервной системы.

6. Смесь для применения по п.5, выбранная из группы, состоящей из:

- (a) смеси, содержащие соединения (2) и (3);
- (b) смеси, содержащие соединения (4) и (5);
- (c) смеси, содержащие соединения (2) и (4); а также
- (d) смеси, содержащие соединения (3) и (5).

7. Соединение по п.2-3 или смеси соединений, определенных по любому из пп.5-6 для применения в качестве лекарственного средства.

8. Соединение или смесь соединений для применения по любому из пп.1 и 4-7, в котором расстройство выбрано из нейродегенеративных заболеваний, заболеваний сосудов головного мозга, судорог, эпилепсии, вирусных заболеваний, нейровоспалительных болезней, опухолей мозга, органических ацидемий, нарушений жирных кислот и генетических митохондриальных расстройств.

9. Соединение или смесь соединений для применения по п.8, в котором заболевание представляет собой нейродегенеративное заболевание.

10. Соединение для применения по п.9, в котором заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, хорею Гентингтона, болезнь Паркинсона или рассеянный склероз.

11. Соединение или смесь соединений для применения по п.8 или 9, в котором заболевание представляет собой лейкодистрофию, такую как аденолейкодистрофию (ALD).

12. Соединение или смесь соединений для применения по п.8, в котором расстройство центральной нервной системы является цереброваскулярным заболеванием.

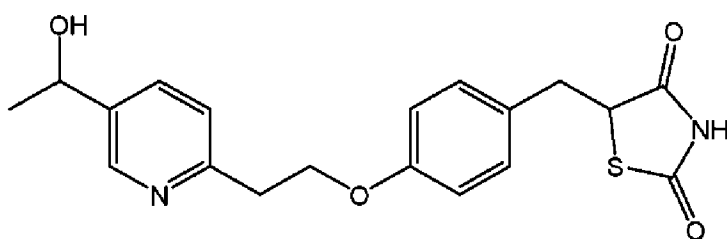
13. Соединение или смесь соединений для применения по любому из пп.1 и 4-12, в котором пациенту также вводят другое терапевтическое средство.

14. Соединение или смесь соединений для применения по п.13, в котором соединение или смесь соединений, и указанное другое терапевтическое средство предоставлены в комбинации.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение, как определено в любом из пп.1-3, или смесь, как определено в любом из пп.5-6.

16. Фармацевтическая композиция по п.15 для применения в лечении или профилактике заболеваний центральной нервной системы.

17. Применение соединения с формулой (1) или его фармацевтически приемлемой соли для изготовления лекарственного средства для лечения или профилактики расстройств центральной нервной системы



(1).

18. Применение соединения с формулой (1) по п.17, которое выбрано из соединений с (2) по (5):

(2) (R)-5-(4-(2-(5-((R)-1-гидроксиэтил)пиридин-2-ил)этоксид)бензил)тиазолидин-2,4-дион

(3) (R)-5-(4-(2-(5-((S)-1-гидроксиэтил)пиридин-2-ил)этоксид)бензил)тиазолидин-2,4-дион

(4) (S)-5-(4-(2-(5-((R)-1-гидроксиэтил)пиридин-2-ил)этоксид)бензил)тиазолидин-2,4-дион

(5) (S)-5-(4-(2-(5-((S)-1-гидроксиэтил)пиридин-2-ил)этоксид)бензил)тиазолидин-2,4-дион

или фармацевтически приемлемой соли этого.

19. Применение смеси одного или нескольких соединений, определенных в п.18, для изготовления лекарственного средства для лечения или профилактики расстройств центральной нервной системы.

20. Применение смеси по п.19, которая выбрана из группы, состоящей из:

(a) смесей, содержащих соединения (2) и (3);

(b) смесей, содержащих соединения (4) и (5);

(с) смесей, содержащих соединения (2) и (4); а также

(d) смесей, содержащих соединения (3) и (5).

21. Применение соединения или смеси соединений по любому из пп.17-20, в котором заболевание выбрано из нейродегенеративных заболеваний, заболеваний сосудов головного мозга, судорог, эпилепсии, вирусных заболеваний, нейровоспалительных болезней, опухолей головного мозга, органические ацидемий, нарушений жирных кислот и генетических митохондриальных расстройств.

22. Применение соединения или смеси соединений по п.21, в котором заболевание представляет собой нейродегенеративное заболевание.

23. Применение соединения по п.22, где заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, хорею Гентингтона, болезнь Паркинсона или рассеянный склероз.

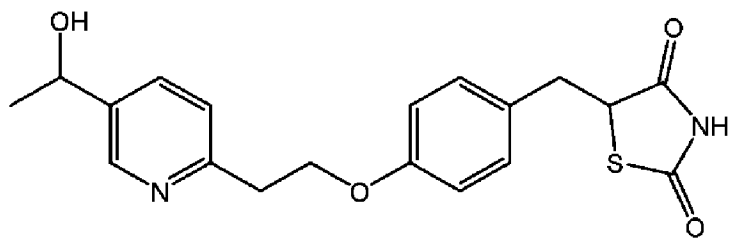
24. Применение соединения или смеси соединений по п.21 или 22, в котором расстройство представляет собой лейкодистрофию, такую как аденолейкодистрофию (ALD).

25. Применение соединения или смеси соединений по п.21, в котором расстройство центральной нервной системы является цереброваскулярным заболеванием.

26. Применение соединения или смеси соединений для применения по любому из пп.17-25, в котором пациенту также вводят другое терапевтическое средство.

27. Применение соединения или смеси соединений для применения по п.26, где соединение или смесь соединений, и указанное другое терапевтическое средство предоставлены в комбинации.

28. Способ лечения или профилактики расстройств центральной нервной системы, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения с формулой (1) или его фармацевтически приемлемой соли



(1).

29. Способ по п.28, в котором соединение с формулой (1) выбрано из соединений с (2) по (5):

(2) (R)-5-(4-(2-(5-((R)-1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил)этоксид) бензил) тиазолидин-2,4-дион

(3) (R)-5-(4-(2-(5-((S)-1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил)этоксид) бензил) тиазолидин-2,4-дион

(4) (S)-5-(4-(2-(5-((R)-1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил)этоксид) бензил) тиазолидин-2,4-дион

(5) (S)-5-(4-(2-(5-((S)-1-гидроксиэтил) пиридин-2-ил)этоксид) бензил) тиазолидин-2,4-дион

или фармацевтически приемлемой соли этого.

30. Способ лечения или профилактики расстройств центральной нервной системы, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества смеси одного или нескольких соединений, определенных в п.29.

31. Способ по п.30, в котором смесь выбрана из группы, состоящей из:

(e) смесей, содержащих соединения (2) и (3);

(f) смесей, содержащих соединения (4) и (5);

(g) смесей, содержащих соединения (2) и (4); а также

(h) смесей, содержащих соединения (3) и (5).

32. Способ по любому из предыдущих пунктов от 28 до 31, в котором заболевание выбрано из нейродегенеративных заболеваний, заболеваний сосудов головного мозга, судорог, эпилепсии, вирусных заболеваний, нейровоспалительных болезней, опухолей головного мозга, органические ацидемий, нарушений жирных кислот и генетических митохондриальных расстройств.

33. Способ по п.32, в котором заболевание представляет собой нейродегенеративное заболевание.

34. Способ по п.33, в котором расстройство представляет собой болезнь Альцгеймера, хорею Гентингтона, болезнь Паркинсона или рассеянный склероз.

35. Способ по п.32 или 33, в котором заболевание представляет собой лейкодистрофию, такую как аденолейкодистрофия (ALD).

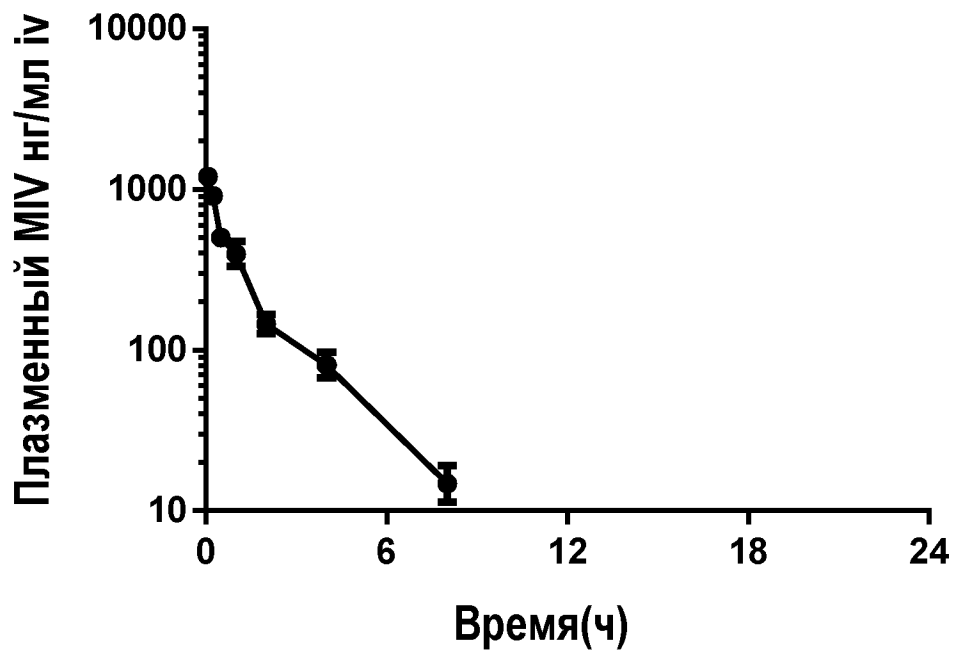
36. Способ по п.32, в котором расстройство центральной нервной системы является цереброваскулярным заболеванием.

37. Способ по любому из пп.28-36, в котором пациенту также вводят другое терапевтическое средство.

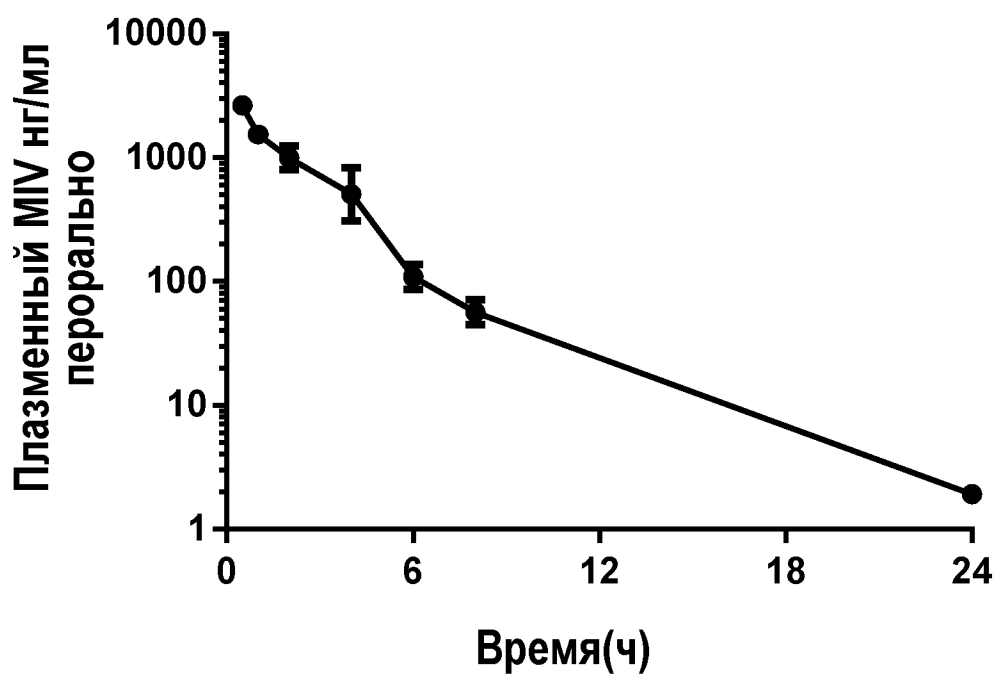
38. Способ по п.37, в котором соединение или смесь соединений, и указанное другое терапевтическое средство предоставлены в комбинации.

По доверенности

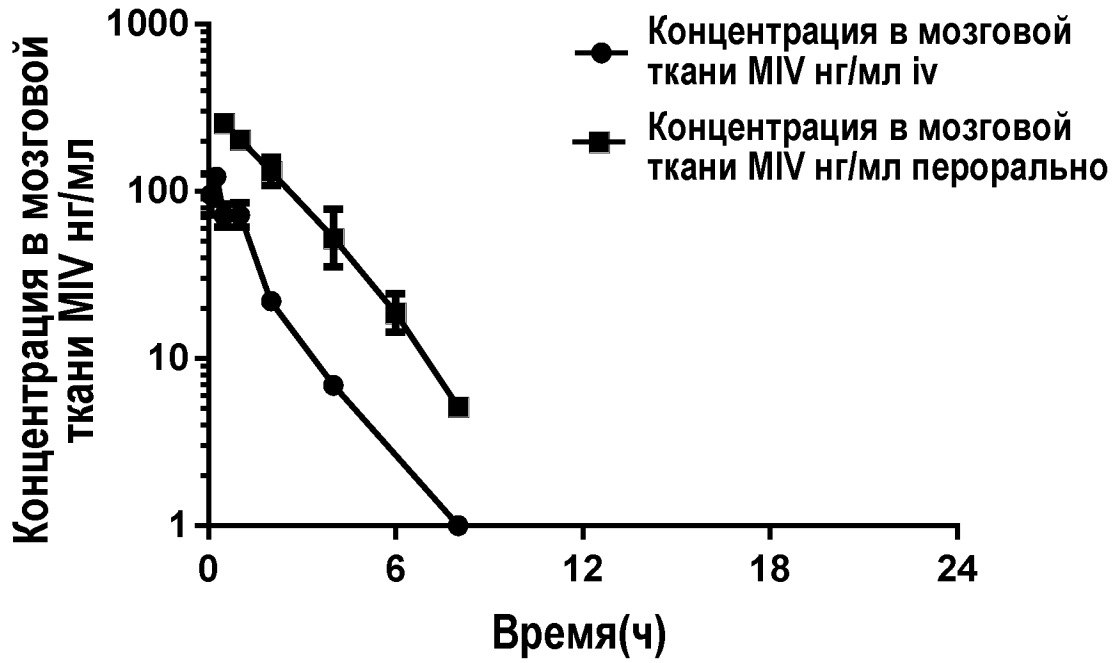
ФИГ. 1



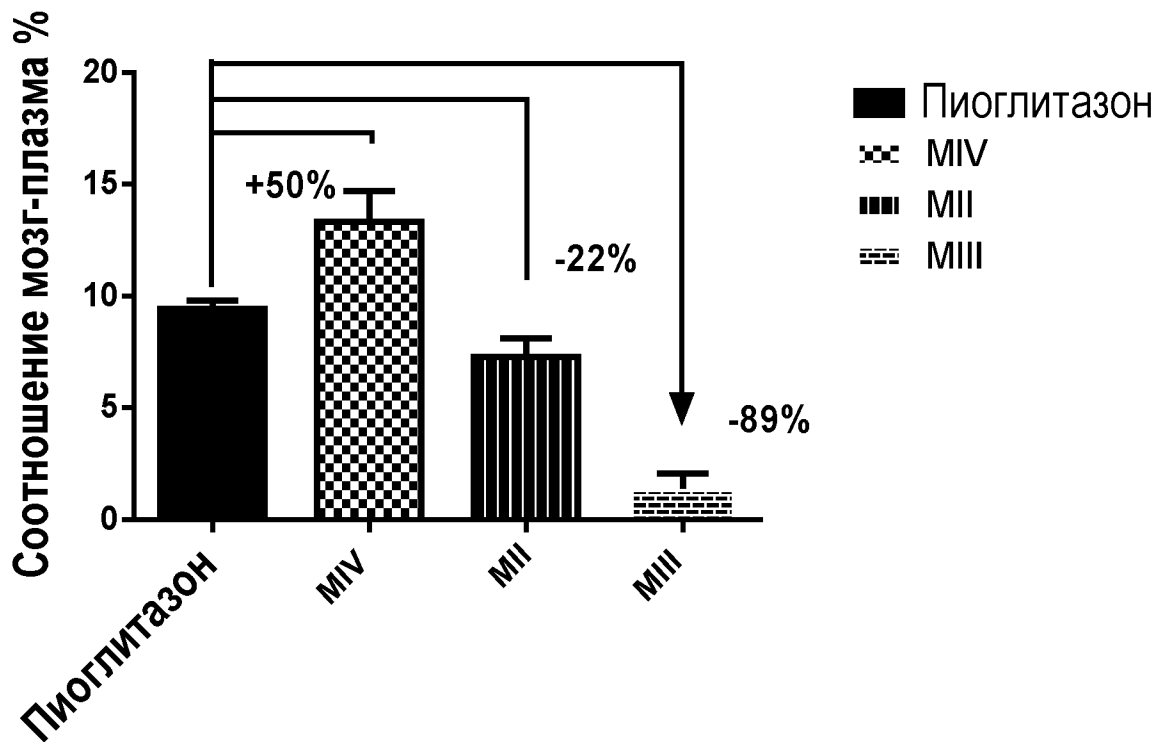
ФИГ. 2



ФИГ. 3

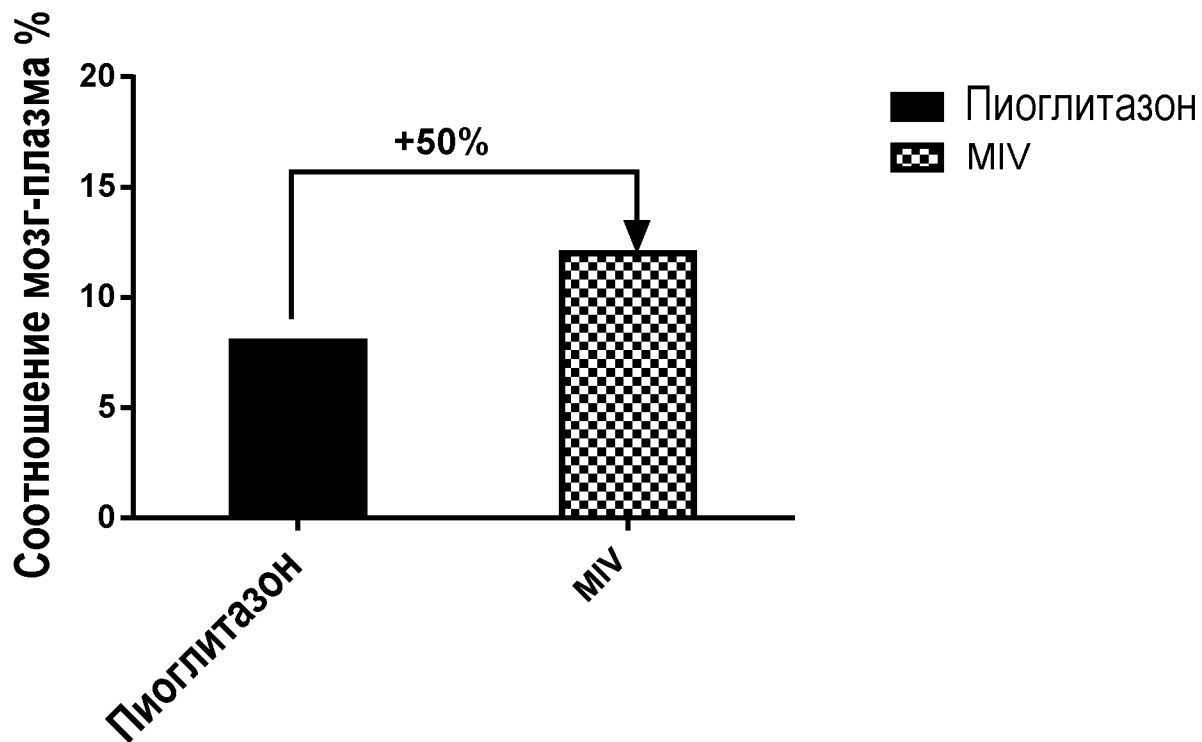


ФИГ. 4

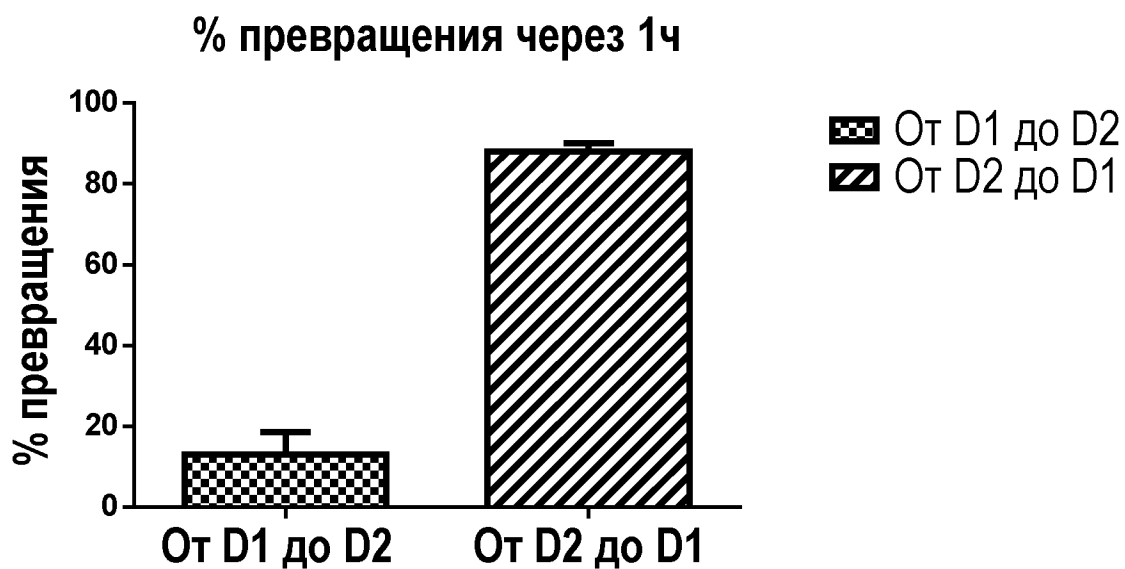




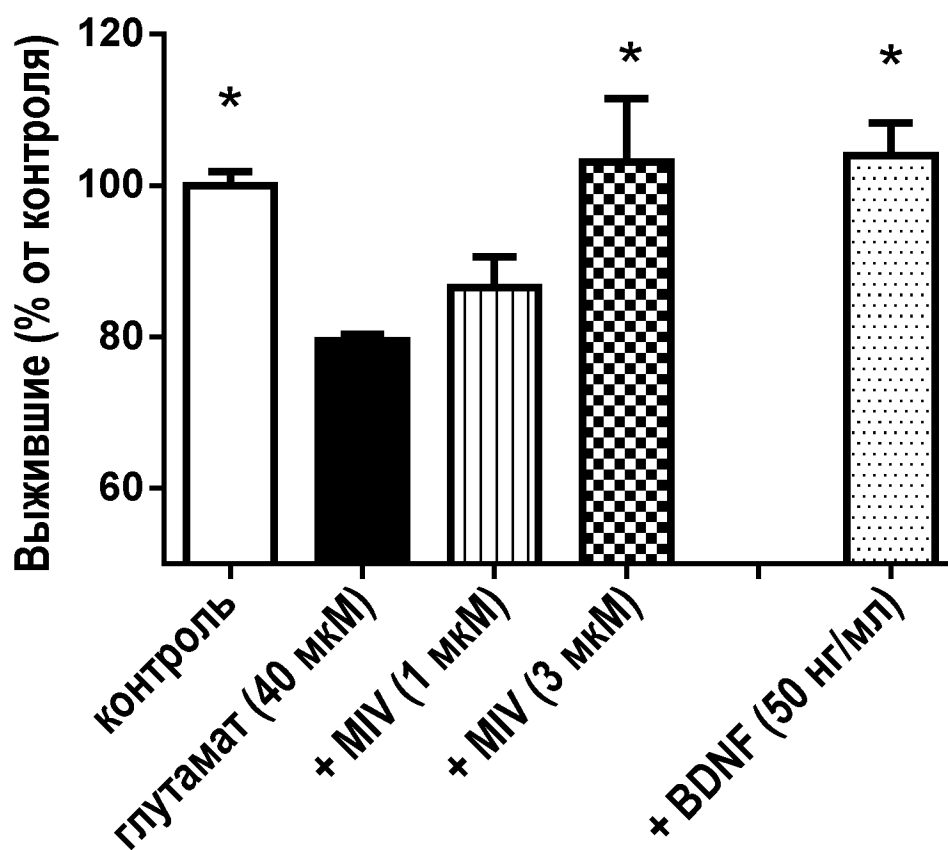
ФИГ. 5



ФИГ. 6

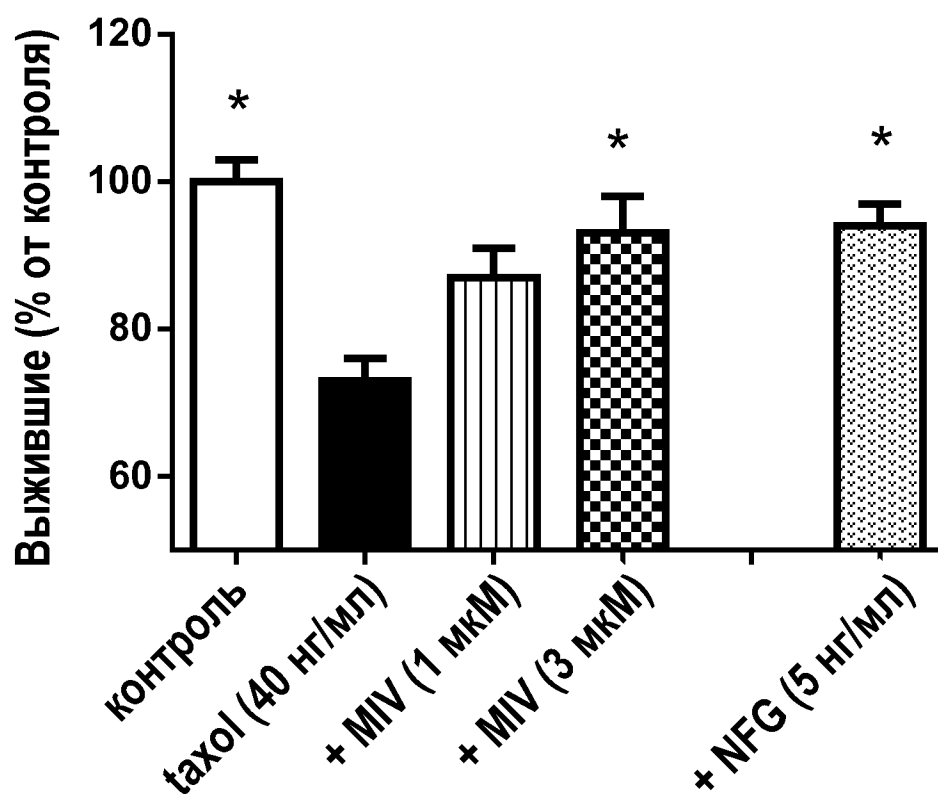


ФИГ. 7



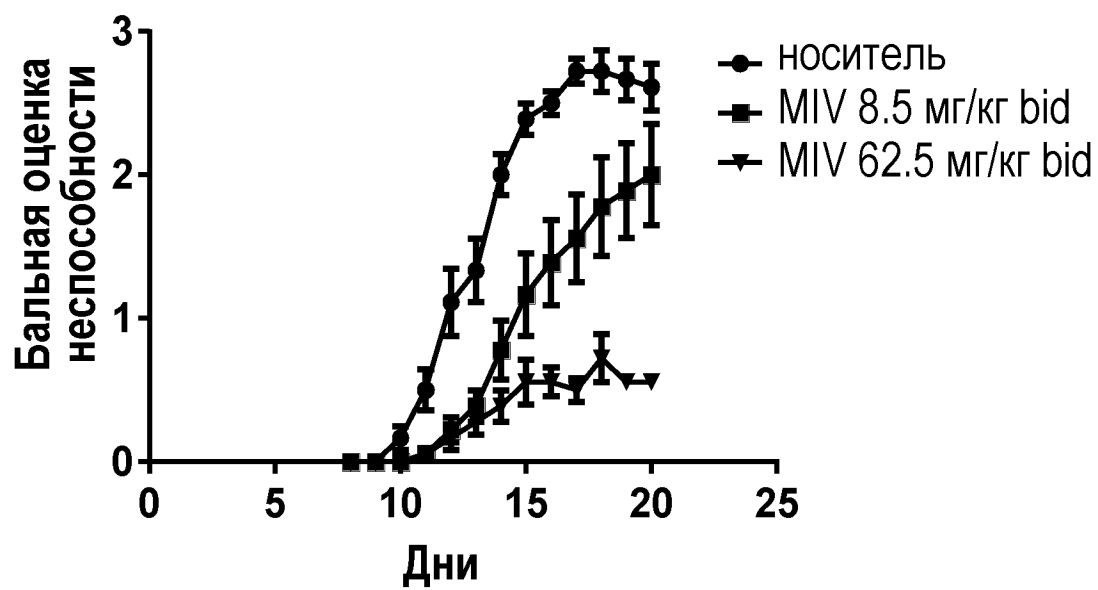
\* $p < 0.05$  односторонний тест ANOVA с последующим тестом Даннета

ФИГ. 8

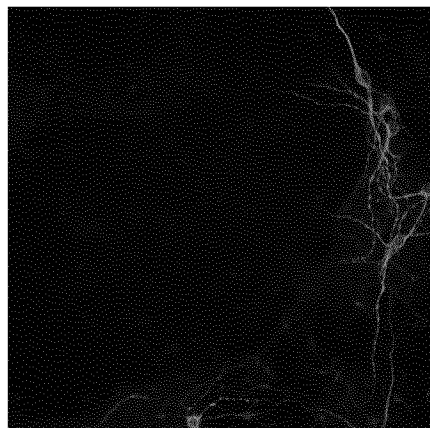
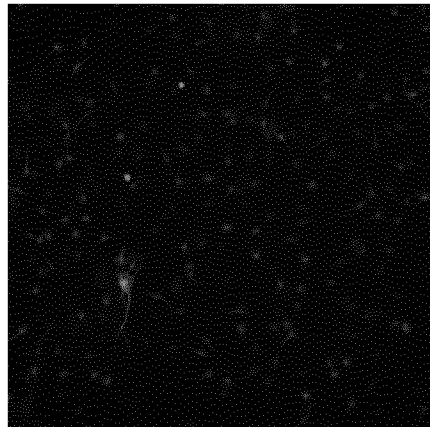
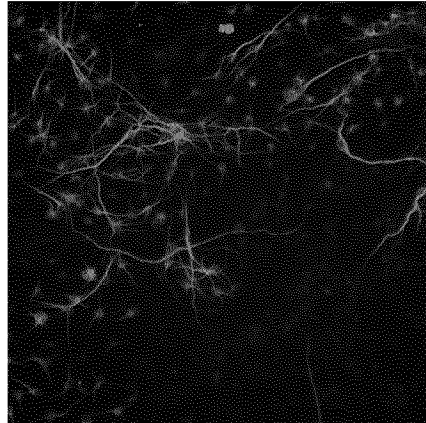


\* $p < 0.05$  односторонний тест ANOVA с последующим тестом Даннета

ФИГ. 9



ФИГ. 10



МК