

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201991542** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

(51) Int. Cl. *A61K 31/437* (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.01.11

(54) **БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ ДЕАЦЕТИЛАЗЫ ГИСТОНОВ**

(31) **62/445,022; 62/555,298**

(32) **2017.01.11; 2017.09.07**

(33) **US**

(86) **PCT/US2018/013260**

(87) **WO 2018/132531 2018.07.19**

(71) Заявитель:
РОДИН ТЕРАПЕУТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Фуллер Нейтан Оливер, Лове Джон А.
III (US)**

(74) Представитель:
**Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М.,
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатулина
Е.М., Строкова О.В., Лебедев В.В.,
Христофоров А.А., Парамонова К.В.,
Глухарёва А.О. (RU)**

(57) В настоящем изобретении предложены соединения и их фармацевтически приемлемые соли и фармацевтические композиции, подходящие для лечения состояний, связанных с ингибированием HDAC (например, HDAC2).

A1

201991542

201991542

A1

БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ ДЕАЦЕТИЛАЗЫ ГИСТОНОВ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США №62/445022, поданной 11 января 2017 года, и предварительной заявки на патент США №62/555298, поданной 7 сентября 2017 года, содержание каждой из которых включено в настоящую заявку посредством ссылки.

ЗАЯВЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО СПОНСИРУЕМЫХ ИЗ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТА ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТОК

[0002] Работа над настоящим изобретением была выполнена при государственной поддержке на средства гранта 1R43AG048651-01A1 в рамках программы поддержки малого бизнеса в области инновационных исследований (SBIR), выделенного Национальным институтом здоровья (НИИ). Государство обладает определенными правами на изобретение.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Было показано, что ингибиторы деацетилаз гистонов (HDAC) модулируют транскрипцию и вызывают блокировку роста клеток, дифференцировку и апоптоз. Ингибиторы HDAC также усиливают цитотоксические эффекты терапевтических агентов, применяемых при лечении рака, включая облучение и химиотерапевтические лекарственные средства. Marks, P., Rifkind, R. A., Richon, V. M., Breslow, R., Miller, T., Kelly, W. K. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer*, 1, 194-202, (2001); и Marks, P. A., Richon, V. M., Miller, T., Kelly, W. K. Histone deacetylase inhibitors. *Adv Cancer Res*, 91, 137-168, (2004). Кроме того, недавно были получены подтверждения тому, что дисрегуляция транскрипции может быть связана с патогенезом на молекулярном уровне при определенных нейродегенеративных расстройствах, таких как болезнь Хантингтона, спинальная мышечная атрофия, боковой амиотрофический склероз и ишемия. Langley, B., Gensert, J. M., Beal, M. F., Ratan, R. R. Remodeling chromatin and stress resistance in the central nervous system: histone deacetylase inhibitors as novel and broadly effective neuroprotective agents. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 4, 41-50, (2005). В выпущенном недавно обзоре были обобщены факты, подтверждающие, что нарушение активности ацетилтрансферазы гистонов (НАТ) и деацетилаз гистонов (HDAC) может представлять собой общий механизм, лежащий в основе нейродегенерации. Кроме того, недавно при использовании модели депрессии у мышей Нестлер (Nestler) показал терапевтический потенциал ингибиторов деацетилазы гистонов (HDAC5) при депрессии. Tsankova, N. M., Berton, O.,

Renthal, W., Kumar, A., Neve, R. L., Nestler, E. J. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci*, 9, 519-525, (2006).

[0004] У человека известно 18 деацетилаз гистонов, которые разделены на четыре класса по структурам вспомогательных доменов. Класс I включает HDAC1, HDAC2, HDAC3 и HDAC8 и гомологичен Rpd3 дрожжей. HDAC4, HDAC5, HDAC7 и HDAC9 принадлежат к классу IIa и гомологичны Hda1 дрожжей. HDAC6 и HDAC10 содержат два каталитических участка, и их относят к классу IIb. Класс III (сиртуины) включает SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 и SIRT7. HDAC11 представляет собой еще один недавно идентифицированный член семейства HDAC и содержит консервативные остатки в каталитическом центре, которые присутствуют также в деацетилазах класса I и класса II, и иногда его выделяют в класс IV.

[0005] Было показано, что HDAC являются мощными отрицательными регуляторами процессов долговременной памяти. Неспецифические ингибиторы HDAC увеличивают синаптическую пластичность, а также долговременную память (Levenson et al., 2004, *J. Biol. Chem.* 279:40545-40559; Lattal et al., 2007, *Behav Neurosci* 121:1125-1131; Vecsey et al., 2007, *J. Neurosci* 27:6128; Bredy, 2008, *Learn Mem* 15:460-467; Guan et al., 2009, *Nature* 459:55-60; Malvaez et al., 2010, *Biol. Psychiatry* 67:36-43; Roozendaal et al., 2010, *J. Neurosci.* 30:5037-5046). Например, ингибирование HDAC может превращать акт обучения, который не вызывает долговременную память, в акт обучения, который формирует значительную долговременную память (Stefanko et al., 2009, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:9447-9452). Кроме того, ингибирование HDAC также может создавать такую форму долговременной памяти, которая недостижима для обычной памяти. Было показано, что ингибиторы HDAC ослабляют когнитивные нарушения в генетических моделях болезни Альцгеймера (Fischer et al., 2007, *Nature* 447:178-182; Kilgore et al., 2010, *Neuropsychopharmacology* 35:870-880). Полученные данные позволяют предположить, что модуляция памяти путем ингибирования HDAC обладает значительным терапевтическим потенциалом при разнообразных нарушениях памяти и когнитивных расстройствах.

[0006] Влияние отдельных HDAC на долговременную память было изучено в двух опубликованных недавно исследованиях. В работе Kilgore et al. 2010, *Neuropsychopharmacology* 35:870-880, показано, что неспецифические ингибиторы HDAC, такие как бутират натрия, ингибируют HDAC класса I (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8) и незначительно действуют на члены семейства HDAC класса IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9). Это позволяет предположить, что ингибирование HDAC класса I может быть важным для усиления когнитивных функций, наблюдаемого во многих

исследованиях. Действительно, повышенная специфическая экспрессия HDAC2, но не HDAC1, в переднем мозге и нейронах снижала плотность дендритных шипиков, плотность синапсов, синаптическую пластичность и формирование памяти (Guan et al., 2009, Nature, 459:55-60). В противоположность этому, у мышей с нокаутом HDAC2 наблюдали 5 повышенную плотность синапсов, повышенную синаптическую пластичность и повышенную плотность дендритных шипиков в нейронах. У указанных мышей с дефицитом HDAC2 также наблюдали повышенную обучаемость и улучшенную память в разнообразных парадигмах научаемого поведения. В данной работе продемонстрировано, что HDAC2 является ключевым регулятором синаптогенеза и синаптической пластичности. 10 Кроме того, Гуан с соавторами (Guan et al) показали, что при долгосрочном лечении мышей SAHA (ингибитор HDAC 1, 2, 3, 6, 8) были воспроизведены эффекты, наблюдаемые у мышей с дефицитом HDAC2, и было устранено когнитивное нарушение у мышей с повышенной экспрессией HDAC2.

[0007] Ингибирование HDAC2 (селективное или в комбинации с ингибитором других 15 HDAC класса I; в качестве первичной мишени или в комплексе совместно с другими белками) является привлекательной терапевтической мишенью. Селективное ингибирование может быть обеспечено путем направленного действия на конкретные изоформы HDAC, такие как HDAC2, отдельно или в составе функционального мультибелкового комплекса. Указанное ингибирование обладает потенциалом для 20 усиления когнитивных функций и процесса обучения за счет увеличения плотности синапсов и дендритных шипиков в популяциях нейронов. Кроме того, ингибирование конкретных HDAC, таких как HDAC2, также можно применять в терапии для лечения различных других заболеваний и нарушений.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

25 **[0008]** Предложены соединения и их фармацевтически приемлемые соли и фармацевтические композиции, которые подходят для лечения состояний, связанных с активностью HDAC (например, HDAC2). (см., например, таблицы 1 и 2).

[0009] Предложенные соединения обеспечивают преимущества, заключающиеся в 30 улучшении гематологической безопасности и общего баланса активности, профилей ADME и PK, по сравнению с ингибиторами, известными из уровня техники. Например, простое замещение водорода в **соединении сравнения E** на метил в **соединении 2** приводит к значительному снижению ингибирования CYP2D6. См., например, **таблицу 2**. Кроме того, данная замена обеспечивает значительное улучшение PK по сравнению с незамещенным

пиримидиновым аналогом, выражающееся в увеличении периода полувыведения, понижении клиренса, повышенной биодоступности и увеличением концентрации в мозге в >5 раз. См., например, **таблицу 3**. Аналогично, встраивание одного атома фтора в орто-положении приводило к значительному увеличению безопасности в линиях прогениторных клеток эритроидного и миелоидного ряда для **соединения 1** по сравнению с **соединением сравнения I**. См., например, **таблицу 5**.

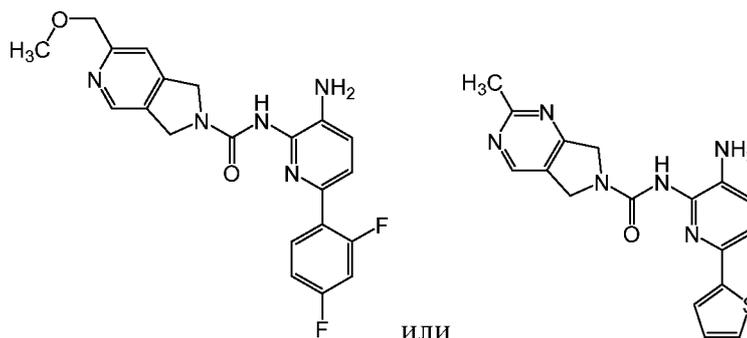
[0010] Описанные соединения также вызывают изменения морфологии дендритных шипиков в области CA1 дорсального гиппокампа у мышей дикого типа. См., например, **таблицу 7**. Определение морфологии дендритного шипика позволяет выявлять фармакологические агенты, которые с большой вероятностью могут усиливать или нарушать нормальную когнитивную функцию и обеспечивать защиту от когнитивных расстройств или усугублять их.

[0011] Состояния, которые могут быть излечены предложенными соединениями, включают, но не ограничиваются ими, неврологические расстройства, нарушения или расстройства памяти или когнитивной функции, нарушения, связанные с угасанием навыков, грибковые заболевания или инфекции, воспалительные заболевания, гематологические заболевания, неопластические заболевания, психиатрические расстройства и потерю памяти.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

20 1. Соединения

[0012] В настоящем изобретении предложено соединение формулы:



или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Определения

25 **[0013]** В настоящем документе термины «субъект» и «пациент», которые могут быть использованы взаимозаменяемо, обозначают млекопитающее, нуждающееся в лечении,

например, домашних животных (например, собак, кошек и т.д.), сельскохозяйственных животных (например, коров, свиней, лошадей, овец, коз и т.д.) и лабораторных животных (например, крыс, мышей, морских свинок и т.д.). Как правило, субъект представляет собой человека, нуждающегося в лечении.

5 **[0014]** Включены фармацевтически приемлемые соли, а также нейтральные формы соединений, описанных в настоящем изобретении. Для применения в лекарственных средствах соли соединений относятся к нетоксичным «фармацевтически приемлемым солям». Формы фармацевтически приемлемых солей включают фармацевтически приемлемые кислые/анионные или основные/катионные соли. Фармацевтически приемлемые основные/катионные соли включают соли натрия, калия, кальция, магния, диэтанолamina, N-метил-D-глюкамина, L-лизина, L-аргинина, аммония, этаноламина, пиперазина и триэтанолamina. Фармацевтически приемлемые кислые/анионные соли включают, например, ацетат, бензолсульфонат, бензоат, бикарбонат, битартрат, карбонат, цитрат, дигидрохлорид, глюконат, глутамат, гликоллиларсанилат, гексилрезорцинат, 10 гидробромид, гидрохлорид, малат, малеат, малонат, мезилат, нитрат, салицилат, стеарат, 15 сукцинат, сульфат, тартрат и тозилат.

[0015] Термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к нетоксичному носителю, адъюванту или наполнителю, который не нарушает фармакологическую активность соединения, совместно с которым его включают в состав. Фармацевтически приемлемые носители, адъюванты или наполнители, подходящие для применения в композициях, описанных в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются ими, ионообменные материалы, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как сывороточный альбумин человека, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновую кислоту, сорбат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как протамина сульфат, гидрофосфат динатрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, карбоксиметилцеллюлозу натрия, полиакрилаты, воски, блоксополимеры полиэтилен-полиоксипропилена, полиэтиленгликоль и ланолин. 20 25

30 **[0016]** Термины «способ лечения», «лечить» и «лечение» относятся к обращению вспять, облегчению, снижению вероятности развития или подавлению прогрессирования заболевания или нарушения или одного или более его симптомов, таких как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах реализации лечение можно проводить после развития одного или более симптомов, т.е. в рамках терапевтического лечения. В

других вариантах реализации лечение можно проводить в отсутствие симптомов. Например, лечение можно проводить у восприимчивого индивидуума перед появлением симптомов (например, с учетом истории симптомов и/или факторов генетической или иной предрасположенности), т.е. в рамках профилактического лечения. Лечение также можно
5 продолжать после устранения симптомов, например, для предупреждения или задержки их повторного появления.

[0017] Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» включает количество соединения, описанного в настоящем изобретении, которое обеспечивает биологический или медицинский ответ у субъекта.

10 3. Применение, состав и введение

[0018] В некоторых вариантах реализации соединения и композиции, описанные в настоящем изобретении, подходят для лечения состояний, связанных с активностью HDAC. Указанные состояния включают, например, те, что описаны ниже.

[0019] В недавних отчетах была подробно описана важность ацетилирования гистонов
15 для функций центральной нервной системы («ЦНС»), таких как дифференцировка нейронов, формирование памяти, лекарственное привыкание и депрессия (Citrome, Psychopharmacol. Bull. 2003, 37, доп. 2, 74-88; Johannessen, CNS Drug Rev. 2003, 9, 199-216; Tsankova et al., 2006, Nat. Neurosci. 9, 519-525; Bousiges et al., 2013, PLoS ONE 8(3), e57816). Таким образом, согласно одному из аспектов предложенные соединения и композиции
20 могут подходить для лечения неврологического расстройства. Примеры неврологических расстройств включают: (i) хронические нейродегенеративные заболевания, такие как дегенерация лобно-височной доли (лобно-височная деменция, ЛВД), ЛВД-GRN (лобно-височная деменция с мутациями в гене GRN), семейный и спорадический боковой амиотрофический склероз (СБАС и БАС, соответственно), семейная и спорадическая
25 болезнь Паркинсона, деменция при болезни Паркинсона, болезнь Хантингтона, семейная и спорадическая болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, мышечная дистрофия, оливопонтocerebellарная атрофия, множественная системная атрофия, болезнь Вильсона, прогрессирующий надъядерный паралич, болезнь диффузных телец Леви, кортикодентатонигральная дегенерация, прогрессирующая семейная миоклоническая
30 эпилепсия, стриатонигральная дегенерация, торсионная дистония, семейный тремор, синдром Дауна, синдром Жилия де ла Туретта, болезнь Халлевордена-Шпатца, диабетическая периферическая нейропатия, деменция боксеров, деменция при СПИД, возрастная деменция, возрастное расстройство памяти и нейродегенеративные

заболевания, связанные с амилоидозом, такие как те, что вызваны прионным белком (PrP), который связан с трансмиссивной губчатой энцефалопатией (болезнь Крейтцфельда-Якоба, синдром Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, почесуха и куру), и те, что вызваны избыточным накоплением цистатина С (наследственная цистатин С-ангиопатия); и (ii) 5 острые нейродегенеративные нарушения, такие как травматическое повреждение мозга (например, повреждение мозга, вызванное хирургической процедурой), отек мозга, повреждение периферических нервов, повреждение позвоночника, болезнь Лея, синдром Гийена-Барре, лизосомные болезни накопления, такие как липофусциноз, болезнь Альпера, синдром беспокойных ног, вертиго, вызванное дегенерацией ЦНС; патологии, 10 возникающие в результате хронической алкогольной или лекарственной зависимости, включая, например, дегенерацию нейронов в голубом пятне и мозжечке, двигательные расстройства, вызванные лекарственными средствами; патологии, возникающие при старении, включая дегенерацию нейронов мозжечка и коры, которая приводит к когнитивным и моторным расстройствам; и патологии, возникающие при хронической 15 амфетаминовой зависимости, включая дегенерацию нейронов базальных ядер, которая приводит к моторным расстройствам; патологические изменения, вызванные фокальной травмой, такой как инсульт, фокальная ишемия, сосудистая недостаточность, гипоксическая-ишемическая энцефалопатия, гипергликемия, гипогликемия или непосредственно травма; патологии, возникающие в качестве негативного побочного 20 эффекта терапевтических лекарственных средств и способов лечения (например, дегенерация нейронов передней поясной и энторинальной коры в ответ на прием противоконвульсивных доз антагонистов глутаматных рецепторов класса NMDA) и деменция, связанная с синдромом Вернике-Корсакова. Неврологические расстройства, поражающие сенсорные нейроны, включают атаксию Фридрейха, диабет, периферическую 25 нейропатию и дегенерацию нейронов сетчатки. Другие неврологические расстройства включают повреждение нервов или травму, связанную с повреждением позвоночника. Неврологические расстройства лимбической и кортикальной систем включают церебральный амилоидоз, атрофию Пика и синдром Ретта. Согласно другому аспекту неврологические расстройства включают нарушения настроения, такие как аффективные 30 расстройства и тревога; нарушения социального поведения, такие как аномалии характера и личностные нарушения; нарушения обучения, ухудшение памяти и умственных способностей, такие как умственная отсталость и деменция. Таким образом, согласно одному из аспектов описанные соединения и композиции можно применять для лечения шизофрении, делирия, синдрома дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ), 35 шизоаффективного расстройства, болезни Альцгеймера, сосудистой деменции, синдрома

Рубинштейна-Тейби, депрессии, мании, расстройств дефицита внимания, лекарственной зависимости, деменции, деменции, включающей проявления BPSD, возбуждения, апатии, тревоги, психозов, личностных расстройств, биполярных расстройств, монополярного аффективного расстройства, обсессивно-компульсивных расстройств, расстройств пищевого поведения, посттравматических стрессовых расстройств, раздражительности, подростковых кондуктивных расстройств и расторможенности. Их также можно применять при спонтанном, токсическом, неопластическом, посттравматическом и постинфекционном тинните и нарушениях обоняния.

[0020] Как полагают, транскрипция является ключевой стадией формирования долговременной памяти (Alberini, 2009, *Physiol. Rev.* 89, 121-145). Транскрипция усиливается специфическими модификациями хроматина, такими как ацетилирование гистонов, в результате которых происходит модуляция взаимодействий гистон-ДНК (Kouzarides, 2007, *Cell*, 128:693-705), а также взаимодействий фактор транскрипции-ДНК. Модифицирующие ферменты, такие как ацетилтрансферазы гистонов (НАТ) и деацетилазы гистонов (HDAC), регулируют уровень ацетилирования концов гистонов. В общем случае, ацетилирование гистонов ускоряет экспрессию генов, тогда как деацетилирование гистонов приводит к выключению гена, и при этом лечение ингибиторами HDAC может приводить как к повышающей, так и к понижающей регуляции уровня экспрессии специфических генов. В многочисленных исследованиях было показано, что высокоактивная НАТ, белок, связывающий цАМФ-чувствительный элемент (CREB), (CBP), необходим для долгоживущих форм синаптической пластичности и долговременной памяти (обзор см. в Barrett, 2008, *Learn Mem* 15:460-467). Таким образом, согласно одному из аспектов предложенные соединения и композиции можно применять для усиления когнитивной функции и улучшения обучаемости и формирования памяти.

[0021] Соединения и композиции, описанные в настоящем изобретении, также можно применять для лечения грибковых заболеваний или инфекций.

[0022] Согласно другому аспекту соединения и композиции, описанные в настоящем изобретении, можно применять для лечения воспалительных заболеваний, таких как инсульт, ревматоидный артрит, красная волчанка, язвенный колит и травматические повреждения мозга (Leoni et al., *PNAS*, 99(5); 2995-3000(2002); Suuronen et al. *J. Neurochem.* 87; 407-416 (2003); и *Drug Discovery Today*, 10: 197-204 (2005).

[0023] Согласно другому аспекту соединения и композиции, описанные в настоящем изобретении, можно применять для лечения рака, вызванного пролиферацией

неопластических клеток. Указанные формы рака включают, например, солидные опухоли, новообразования, карциномы, саркомы, лейкозы, лимфомы и т.д. Согласно одному из аспектов формы рака, которые могут быть излечены соединениями и композициями, описанными в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются ими: рак сердца, рак легкого, рак желудочно-кишечного тракта, рак мочеполовой системы, рак печени, рак нервной системы, гинекологический рак, гематологический рак, рак кожи и рак надпочечников. Согласно одному из аспектов соединения и композиции, описанные в настоящем изобретении, подходят для лечения раковых заболеваний сердца, выбранных из саркомы (ангиосаркомы, фибросаркомы, рабдомиосаркомы, липосаркомы), миксомы, рабдомиомы, фибромы, липомы и тератомы. Согласно другому аспекту соединения и композиции, описанные в настоящем изобретении, подходят для лечения рака легкого, выбранного из бронхогенной карциномы (плоскоклеточной, недифференцированной мелкоклеточной, недифференцированной крупноклеточной, аденокарциномы), альвеолярной (бронхиолярной) карциномы, бронхиальной аденомы, саркомы, лимфомы, хондроматозной гамартомы и мезотелиомы. Согласно одному из аспектов соединения и композиции, описанные в настоящем изобретении, подходят для лечения рака желудочно-кишечного тракта, выбранного из рака пищевода (плоскоклеточная карцинома, аденокарцинома, лейомиосаркома, лимфома), желудка (карцинома, лимфома, лейомиосаркома), поджелудочной железы (протоковая аденокарцинома, инсулинома, глюкагонома, гастринома, карциноидные опухоли, випома), тонкого кишечника (аденокарцинома, лимфома, карциноидные опухоли, саркома Капоши, лейомиома, гемангиома, липома, нейрофиброма, фиброма) и толстого кишечника (аденокарцинома, канальцевая аденома, ворсинчатая аденома, гамартома, лейомиома). Согласно одному из аспектов соединения и композиции, описанные в настоящем изобретении, подходят для лечения рака мочеполовой системы, выбранного из рака почки (аденокарцинома, опухоль Вильмса [нефробластома], лимфома, лейкоз), мочевого пузыря и мочеиспускательного канала (плоскоклеточная карцинома, переходо-клеточная карцинома, аденокарцинома), предстательной железы (аденокарцинома, саркома) и яичек (семинома, тератома, эмбриональная карцинома, тератокарцинома, хориокарцинома, саркома, саркома из интерстициальных клеток, фиброма, фиброаденома, аденоматоидные опухоли, липома). Согласно одному из аспектов соединения и композиции, описанные в настоящем изобретении, подходят для лечения рака печени, выбранного из гепатомы (печеночноклеточная карцинома), холангиокарциномы, гепатобластомы, ангиосаркомы, печеночноклеточной аденомы и гемангиомы.

[0024] В некоторых вариантах реализации соединения, описанные в настоящем изобретении, применяют для лечения рака кости, выбранного из остеогенной саркомы (остеосаркомы), фибросаркомы, злокачественной фиброзной гистиоцитомы, хондросаркомы, саркомы Юинга, злокачественной лимфомы (ретикулоклеточной саркомы), множественной миеломы, злокачественной гигантоклеточной хордомы, остеохондромы (костнохрящевого экзостоза), доброкачественной хондромы, хондробластомы, хондромиксофибромы, остеонной остеомы и гигантоклеточных опухолей.

[0025] Согласно одному из аспектов соединения и композиции, описанные в настоящем изобретении, подходят для лечения рака нервной системы, выбранного из рака черепа (остеомы, гемангиомы, гранулемы, ксантомы, деформирующего остеоита), оболочки головного мозга (менингиомы, менингиосаркомы, глиоматоза), мозга (астроцитомы, медуллобластомы, глиомы, эпиндимомы, герминомы [пинеаломы], мультиформной глиобластомы, олигодендроглиомы, шванномы, ретинобластомы, врожденных опухолей) и позвоночника (нейрофибромы, менингиомы, глиомы, саркомы).

[0026] Согласно одному из аспектов соединения и композиции, описанные в настоящем изобретении, подходят для лечения гинекологического рака, выбранного из рака матки (карциномы эндометрия), шейки матки (карциномы шейки матки, предопухоловой дисплазии шейки матки), яичников (карциномы яичников [серозной цистаденокарциномы, муцинозной цистаденокарциномы, неклассифицированной карциномы]), гранулезотеккаклеточные опухоли, опухоли из клеток Сертоли-Лейдига, дисгерминомы, злокачественной тератомы), наружных половых органов (плоскоклеточной карциномы, внутриэпителиальной карциномы, аденокарциномы, фибросаркомы, меланомы), влагалища (светлоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы, ботриоидной саркомы (эмбриональной рабдомиосаркомы) и фаллопиевых труб (карциномы).

[0027] Согласно одному из аспектов соединения и композиции, описанные в настоящем изобретении, подходят для лечения рака кожи, выбранного из злокачественной меланомы, базальноклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы, саркомы Капоши, синдрома диспластического невуса, липомы, ангиомы, дерматофибромы, келоидов и псориаза.

[0028] Согласно одному из аспектов соединения и композиции, описанные в настоящем изобретении, подходят для лечения рака надпочечников, выбранного из нейробластомы.

[0029] Согласно одному из аспектов соединения и композиции, описанные в настоящем изобретении, подходят для лечения форм рака, которые включают, но не ограничиваются

ими: лейкозы, включая острые лейкозы и хронические лейкозы, такие как острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ) волосатоклеточный лейкоз; лимфомы, такие как кожные Т-клеточные лимфомы (КТКЛ), некожные периферические Т-клеточные лимфомы, лимфомы, связанные с Т-лимфотропным вирусом человека (HTLV), такие как Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых (ATLL), болезнь Ходжкина и неходжкинские лимфомы, крупноклеточные лимфомы, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL); лимфому Беркитта; мезотелиому, первичную лимфому центральной нервной системы (ЦНС); множественную миелому; детские солидные опухоли, такие как опухоли мозга, нейробластома, ретинобластома, опухоль Вильмса, опухоли кости и саркомы мягких тканей, часто встречающиеся солидные опухоли взрослых, такие как рак головы и шеи (например, полости рта, гортани и пищевода), рак мочеполовой системы (например, предстательной железы, мочевого пузыря, почки, матки, яичников, яичек, прямой кишки и толстой кишки), рак легкого, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, меланому и другие раковые заболевания кожи, рак желудка, опухоли мозга, рак печени и рак щитовидной железы.

[0030] Согласно одному из аспектов соединения и композиции, описанные в настоящем изобретении, подходят для лечения состояния у субъекта, выбранного из неврологического расстройства, расстройства или ухудшения памяти или когнитивной функции, нарушения, связанного с угасанием навыков, грибкового заболевания или инфекции, воспалительного заболевания, гематологического заболевания, психиатрических расстройств и неопластического заболевания. Согласно другому аспекту соединения и композиции, описанные в настоящем изобретении, подходят для лечения состояния, выбранного из а) расстройства или ухудшения когнитивной функции, связанного с болезнью Альцгеймера, болезнью Хантингтона, потерей памяти, вызванной эпилептическим припадком, шизофренией, синдромом Рубинштейна-Тейби, синдромом Ретта, ломкой X-хромосомой, деменцией с тельцами Леви, сосудистой деменцией, лобно-височной дегенерацией (лобно-височной деменцией, ЛВД), ЛВД-GRN (лобно-височной деменцией с мутациями в гене GRN), СДВГ, дислексией, биполярным расстройством, социальных, когнитивных расстройств и расстройств нарушения обучения, связанных с аутизмом, травматическим повреждением головы, расстройством дефицита внимания, тревожным расстройством, условно-рефлекторной реакцией страха, паническим расстройством, обсессивно-компульсивным расстройством, посттравматическим стрессовым расстройством (PTSD),

фобией, социальным тревожным расстройством, восстановлением после лекарственной зависимости, возрастным ухудшением памяти (ААМ), возрастным снижением когнитивных функций (ARCD), атаксией или болезнью Паркинсона; b) гематологического заболевания, выбранного из острого миелоидного лейкоза, острого промиелоцитарного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического миелогенного лейкоза, миелодиспластических синдромов и серповидноклеточной анемии; c) неопластического заболевания; и d) нарушений, связанных с угасанием навыков, выбранных из угасания, вызванного страхом, и посттравматического стрессового расстройства. Согласно одному из аспектов состояние, которое лечат соединениями и композициями, описанными в настоящем изобретении, представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, лобно-височную деменцию, атаксию Фридрейха, посттравматическое стрессовое расстройство (PTSD), болезнь Паркинсона, депрессию или восстановление после лекарственной зависимости.

[0031] Согласно одному из аспектов в настоящем изобретении предложен способ лечения состояния, описанного в настоящем изобретении, включающий введение субъекту эффективного количества соединения или фармацевтически приемлемой соли, описанного(-ой) в настоящем изобретении, или содержащей его композиции.

[0032] Также предложено применение одного или более соединений или их фармацевтически приемлемых солей, описанных в настоящем изобретении, или предложенной композиции для лечения состояния, описанного в настоящем изобретении.

[0033] Также предложено применение одного или более соединений или их фармацевтически приемлемых солей, описанных в настоящем изобретении, для получения лекарственного средства для лечения состояния, описанного в настоящем изобретении.

[0034] Также можно выбирать субъектов, страдающих от одного или более описанных состояний перед проведением лечения одним или более описанными соединениями или их фармацевтически приемлемыми солями или композициями.

[0035] В настоящем изобретении также предложены фармацевтически приемлемые композиции, содержащие соединение, описанное в настоящем изобретении, или его фармацевтически приемлемую соль; и фармацевтически приемлемый носитель. Указанные композиции можно применять для лечения одного или более состояний, описанных выше.

[0036] Композиции, описанные в настоящем изобретении, можно вводить перорально, парентерально, путем распыления для ингаляции, местно, ректально, интраназально, трансбуккально, внутривагинально или в виде имплантируемого резервуара. Термин

«парентеральный» в настоящем изобретении включает способы подкожной, внутривенной, внутримышечной, внутрисосудистой, интрасиновиальной, внутригрудинной, интратекальной, внутрипеченочной, внутриочаговой и интракраниальной инъекции или инфузии. В настоящее изобретение включены жидкие лекарственные формы, инъекционные препараты, формы твердых дисперсий и лекарственные формы для местного или чрескожного введения соединения.

[0037] Количество предложенных соединений, которое может быть объединено с веществами-носителями для получения композиции в виде лекарственной формы с однократной дозировкой, может быть различным в зависимости от пациента, которого лечат, и конкретного способа введения. В некоторых вариантах реализации предложенные композиции могут быть получены таким образом, чтобы дозировка 0,01 - 100 мг/массы тела/день предложенного соединения, такая как, например, 0,1 – 100 мг/кг массы тела/день, могла быть доставлена пациенту, которому вводят указанные композиции.

[0038] Также следует понимать, что конкретная дозировка и режим лечения для любого конкретного пациента зависят от ряда факторов, включая возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, рацион, время введения, скорость выведения, комбинацию лекарственных средств, выбор лечащего врача и тяжесть конкретного заболевания, подвергающегося лечению. Количество предложенного соединения в композиции также может зависеть от конкретного соединения, включенного в композицию.

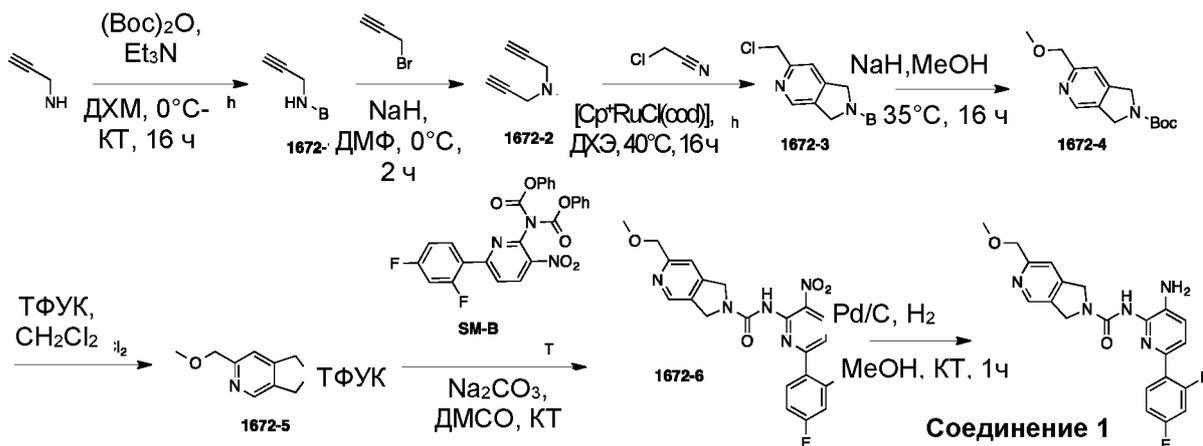
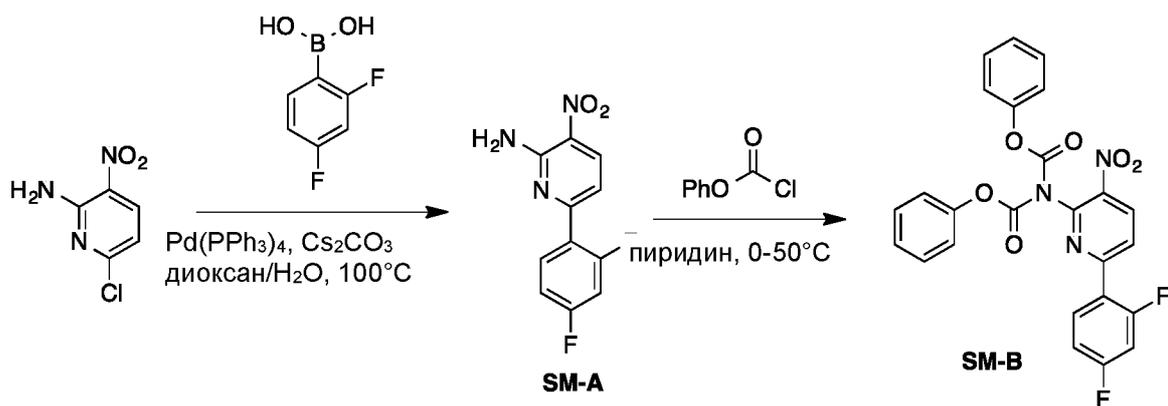
ПРИМЕРЫ

[0039] Визуализацию пятен проводили в УФ области (254 и 365 нм). Очистку путем колоночной и флэш-хроматографии проводили на силикагеле (200-300 меш). Системы растворителей указаны при помощи отношения растворителей.

[0040] Спектры ЯМР получали на спектрометре Bruker 400 (400 МГц). Химические сдвиги ^1H указаны в виде значений δ в ppm относительно тетраметилсилана (TMS = 0,00 ppm) в качестве внутреннего стандарта. См., например, данные, приведенные в **таблице 1**.

[0041] Спектры ЖХМС получали на масс-спектрометре Agilent 1200 серии 6110 или 6120 в режиме ионизации ИЭР (+). См., например, данные, приведенные в **таблице 1**.

Пример 1



[0042] Синтез SM-A.

[0043] В смесь 6-хлор-3-нитропиридин-2-амин (4,58 г, 26,4 ммоль), 2,4-дифторфенилбороновой кислоты (5,00 г, 31,7 ммоль) и Cs_2CO_3 (25,73 г, 79,2 ммоль) в смеси диоксан/ H_2O (100 мл/10 мл) добавляли $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (1,10 г, 0,95 ммоль) в атмосфере N_2 . Перемешивали смесь при 100°C в течение 2 часов, а затем концентрировали в вакууме. Растворяли остаток в EtOAc (200 мл) и промывали раствор солевым раствором (100 мл \times 3). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , а затем концентрировали в вакууме. Очищали остаток путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ : EtOAc = 7 : 1 ~ 5 : 1) с получением **SM-A** (4,0 г, 61%) в виде желтого твердого вещества. МС 252,1 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

[0044] Синтез SM-B.

[0045] В перемешиваемый раствор **SM-A** (4,0 г, 15,94 ммоль) в пиридине (60 мл) по каплям добавляли бензилкарбонхлоридат (7,50 г, 47,81 ммоль) при 0°C . После завершения добавления перемешивали смесь при 50°C в течение 4 часов. Концентрировали смесь в вакууме. Очищали остаток путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ : DCM = 3 : 2 ~ 1 : 1) с получением **SM-B** (7,1 г, 91%) в виде желтого твердого вещества. МС 492,1 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

[0046] Синтез 1672-1.

[0047] В раствор проп-2-ин-1-амина (5,0 г, 90,9 ммоль) и Et₃N (18,4 г, 181,8 ммоль) в ДХМ (100 мл) по каплям добавляли (Вос)₂O (23,8 г, 109,1 ммоль), охлаждая реакционную смесь на ледяной бане. Удаляли полученную смесь из ледяной бани после завершения добавления и затем перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. После завершения взаимодействия разбавляли смесь ДХМ (200 мл), промывали соевым раствором (100 мл × 3) и сушили органический слой над Na₂SO₄, а затем концентрировали в вакууме. Очищали остаток путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ : EtOAc = 100 : 1 ~ 10 : 1) с получением **1672-1** (10 г, 71%) в виде бесцветного маслянистого вещества. МС 178,3 [M + 23]⁺, 100,3 [M - 56]⁺.

10 **[0048]** *Синтез 1672-2.*

[0049] В раствор **1672-1** (10 г, 64,5 ммоль) в ДМФ (200 мл) медленно добавляли NaN (60% в минеральном масле) (2,84 г, 71 ммоль) на ледяной бане. Перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего в полученную выше смесь добавляли 3-бромпроп-1-ин (9,2 г, 77,4 ммоль) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 2 часов. Гасили реакцию водой (500 мл), а затем экстрагировали смесь t-BuOMe (250 мл × 3). Объединенные органические слои промывали соевым раствором (200 мл × 3), сушили над безводным Na₂SO₄, а затем концентрировали в вакууме. Очищали остаток путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ : EtOAc = 100 : 1 ~ 10 : 1) с получением **1672-2** (12 г, 96%) в виде желтого маслянистого вещества. МС 138,1 [M - 56]⁺.

20 **[0050]** *Синтез 1672-3.*

[0051] В раствор 2-хлорацетонитрила (3,13 г, 41,4 ммоль) и [Cr*RuCl(cod)] (394 мг, 1,0 ммоль) в ДХЭ (40 мл) по каплям добавляли раствор **1672-2** (4,0 г, 20,7 ммоль) в ДХЭ (80 мл) в течение 30 минут в атмосфере N₂. Перемешивали полученную смесь при 40°C в течение 16 часов. Удаляли растворитель в вакууме и очищали остаток путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ : EtOAc = 10 : 1 ~ 2 : 1) с получением **1672-3** (2,1 г, 22%) в виде твердого вещества цвета хаки. МС 269,3 [M + H]⁺.

[0052] *Синтез 1672-4.*

[0053] В раствор MeOH (30 мл) добавляли NaN (60% в минеральном масле) (940 мг, 23,5 ммоль) на ледяной бане и перемешивали в течение 30 минут. Затем в полученную выше смесь добавляли **1672-C** (2,1 г, 7,8 ммоль) и перемешивали при 35°C в течение 16 часов. Гасили реакцию водой (30 мл), экстрагировали смесь ДХМ (10 мл × 3). Объединенные органические слои промывали соевым раствором (10 мл × 3), сушили над безводным

Na₂SO₄, а затем концентрировали в вакууме. Очищали остаток путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ : EtOAc = 100 : 1 ~ 10 : 1) с получением **1672-4** (1,8 г, 94%) в виде бежевого твердого вещества. МС 265,1 [М + Н]⁺.

[0054] Синтез 1672-5.

5 **[0055]** В раствор **1672-4** (120 мг, 0,45 ммоль) в ДХМ (6 мл), охлажденный на ледяной бане, по каплям добавляли ТФУК (2 мл). Перемешивали полученную реакционную смесь при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего удаляли растворитель в вакууме с получением **1672-5** в качестве неочищенного продукта, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. МС 165,1 [М + Н]⁺.

10 **[0056] Синтез 1672-6.**

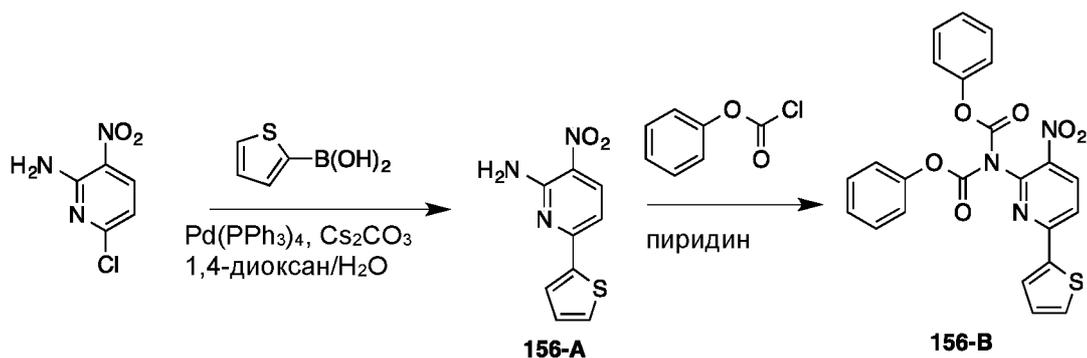
[0057] В смесь **1672-5** (0,45 ммоль, неочищенный продукт предыдущей стадии) и **SM-B** (150 мг, 0,30 ммоль) в ДМСО (10 мл) добавляли Na₂CO₃ (259 мг, 3,44 ммоль) и перемешивали полученную реакционную смесь при 25°C в течение 2 часов. Затем разбавляли смесь водой (30 мл) и экстрагировали EtOAc (20 мл × 3). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (10 мл × 3), сушили над безводным Na₂SO₄, а затем концентрировали в вакууме. Очищали остаток путем колоночной хроматографии на силикагеле (ДХМ : MeOH = 100 : 1 ~ 30 : 1) с получением **1672-6** (120 мг, 89%) в виде желтого твердого вещества. МС 442,1 [М + Н]⁺.

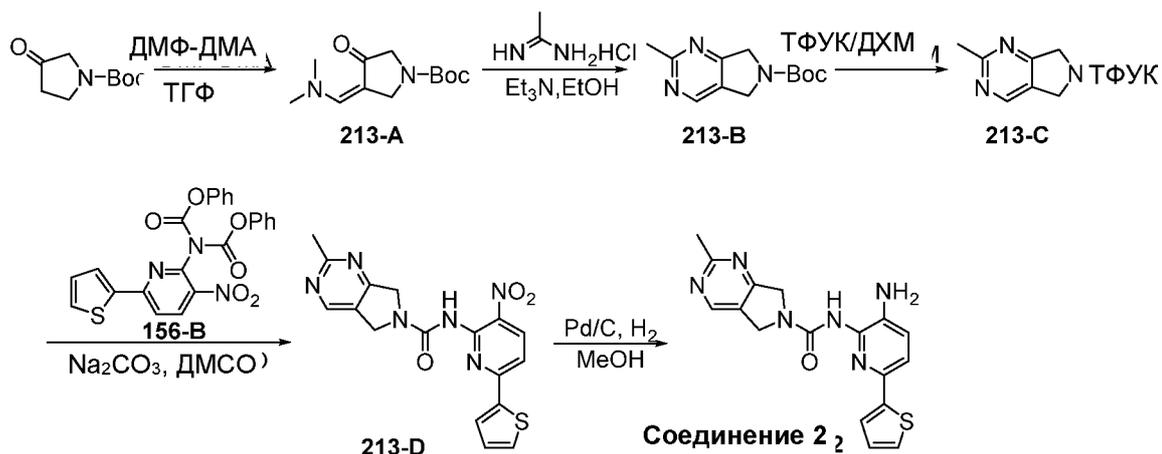
[0058] Синтез соединения 1.

20 **[0059]** Смесь **1672-6** (120 мг, 0,27 ммоль) и Pd/C (120 мг) в MeOH (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа в атмосфере H₂. Затем удаляли Pd/C путем фильтрования через целит. Концентрировали фильтрат и очищали остаток путем препаративной ТСХ (ДХМ : MeOH = 15 : 1) с получением **соединения 1** (70 мг, 70%) в виде желтого твердого вещества. МС 412,1 [М + Н]⁺, 434,1 [М + 23]⁺.

25

Пример 2





[0060] *Синтез 156-A.*

[0061] В смесь 6-хлор-3-нитропиридин-2-амина (10,00 г, 57,6 ммоль), тиофен-2-илбороновой кислоты (8,12 г, 63,4 ммоль) и Cs_2CO_3 (37,56 г, 115,2 ммоль) в смеси диоксан/ H_2O (200 мл/20 мл) добавляли $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (2,44 г, 2,88 ммоль) в атмосфере N_2 . Перемешивали смесь при 95°C в течение 2 часов, а затем концентрировали в вакууме. Растворяли остаток в EtOAc (200 мл) и промывали раствор солевым раствором (100 мл \times 3). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , а затем концентрировали в вакууме. Очищали остаток путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ : EtOAc = 5 : 1 ~ 3 : 1) с получением **156-A** (10,0 г, 79%) в виде желтого твердого вещества.

[0062] *Синтез 156-B.*

[0063] В перемешиваемый раствор **156-A** (1,30 г, 5,88 ммоль) в пиридине (20 мл) по каплям добавляли фенилкарбонхлоридат (2,29 г, 14,7 ммоль). После завершения добавления нагревали смесь до 50°C и перемешивали в течение 4 часов. Затем концентрировали смесь в вакууме и очищали остаток путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ : EtOAc = 8 : 1 ~ 3 : 1) с получением **156-B** (2,4 г, 89%) в виде желтого твердого вещества.

[0064] *Синтез 213-A.*

[0065] Раствор трет-бутил-3-оксопирролидин-1-карбоксилата (150,0 г, 809,8 ммоль) и ДМФ-ДМА (289,5 г, 2,4 моль) в ТГФ (1500 мл) перемешивали при 70°C в течение 16 часов. Концентрировали раствор в вакууме с получением **213-A** в качестве неочищенного продукта, который непосредственно использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

[0066] *Синтез 213-B.*

[0067] В раствор **213-A** (809,8 ммоль, неочищенный продукт предыдущей стадии) в EtOH (1000 мл) добавляли Et₃N (409,7 г, 4,0 моль) и гидрохлорид ацетимидамида (306,2 г, 3,2 моль). Перемешивали полученный раствор при 80°C в течение 24 часов. После охлаждения смеси до комнатной температуры разбавляли смесь водой (500 мл) и экстрагировали ДХМ (500 мл × 3). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (500 мл × 3), сушили над безводным Na₂SO₄, а затем концентрировали в вакууме. Очищали остаток путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ : ДХМ = 10 : 1 ~ 1 : 2) с получением **213-B** (105,0 г, 55%) в виде коричневого твердого вещества.

[0068] *Синтез 213-C.*

10 [0069] В раствор **213-B** (105,0 г, 446,3 ммоль) в ДХМ (1000 мл) по каплям добавляли ТФУК (333 мл). Перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего концентрировали раствор в вакууме с получением **213-C** в качестве неочищенного продукта, который использовали непосредственно на следующей стадии.

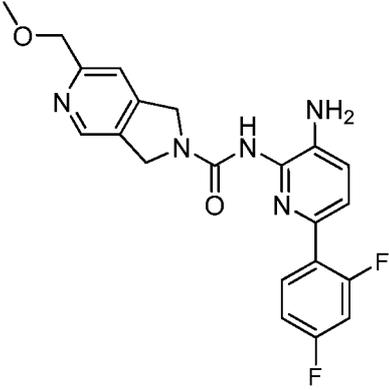
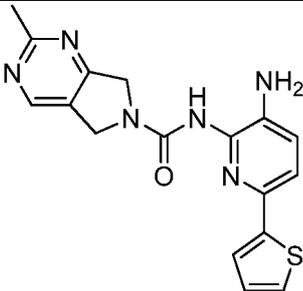
[0070] *Синтез 213-D.*

15 [0071] Смесь **213-C** (325,1 ммоль, неочищенный продукт предыдущей стадии) и **156-B** (75,0 г, 162,5 ммоль) в ДМСО (750 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут, затем добавляли Na₂CO₃ (137,8 г, 1,3 моль) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем разбавляли смесь водой (1000 мл) и экстрагировали EtOAc (500 мл × 3). Объединенные органические слои промывали солевым
20 раствором (500 мл × 3), сушили над безводным Na₂SO₄, а затем концентрировали в вакууме. Очищали остаток путем колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ : ЭА = 10 : 1 ~ 1 : 2) с получением **213-D** (44,0 г, 71%) в виде желтого твердого вещества.

[0072] *Синтез соединения 2.*

[0073] Смесь **213-D** (44,0 г, 115,1 ммоль) и Pd/C (22,0 г) в MeOH (250 мл) и ДХМ (250 мл)
25 перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа в атмосфере H₂. Удаляли Pd/C путем фильтрования через целит. Концентрировали фильтрат в вакууме и очищали остаток путем колоночной хроматографии на силикагеле (ДХМ : MeOH = 50 : 1 ~ 15 : 1) с получением **соединения 2** (26,0 г, 64%) в виде светло-желтого твердого вещества.

Таблица 1. Спектрометрические данные соединений

№	Структура	МС, расч.	МС, эксп.	Данные ¹ H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d ₆)
1		411	412	δ 8,58 (s, 1H), 8,53 (s, 1H), 7,97 – 7,91 (m, 1H), 7,44 – 7,40 (m, 2H), 7,32 – 7,26 (m, 1H), 7,18 – 7,13 (m, 2H), 5,28 (s, 2H), 4,82 (s, 4H), 4,52 (s, 2H), 3,38 (s, 3H).
2		352	353	δ 8,70 (s, 1H), 8,60 (s, 1H), 7,53 – 7,47 (m, 2H), 7,42 – 7,40 (q, J = 4,0 Гц, 1H), 7,13 – 7,07 (t, J = 8,0 Гц, 1H), 7,06 – 7,05 (t, J = 1,2 Гц, 1H), 5,18 (s, 2H), 4,78 – 4,75 (d, J = 10,4 Гц, 4H), 2,64 (s, 3H).

Общая методика исследования

Ферментное исследование HDAC2 и HDAC1

- 5 [0074] Далее описан протокол исследования для измерения уровня деацетилирования пептидного субстрата ферментами HDAC2 или HDAC1.
- [0075] Все рекомбинантные HDAC человека приобретали в BPS Bioscience. Субстрат, FAM-TSRHK(AC)KL-CONH₂, синтезировали в NanoSyn. Конечные анализируемые
- 10 реакционные смеси содержали 100 мМ HEPES (pH 7,5), 50 мМ KCl, 0,1% БСА, 0,01% Triton X-100, 1% ДМСО, 1 мкМ субстрата и 5 нМ фермента HDAC. Ферменты и соединения предварительно инкубировали при 25°C в течение 5 часов, реакции запускали путем добавления субстрата. 10 мкл реакционных смесей инкубировали в течение 17 часов при 25°C и обрывали реакции путем добавления 40 мкл буфера, содержащего 100 мМ HEPES (pH 7,5), 0,1% БСА, 0,01% Triton X-100 и 0,05% ДСН. Субстраты и пептидные продукты,
- 15 содержащиеся в каждом образце, разделяли путем электрофореза на оборудовании для капиллярного электрофореза LabChip 3000. Изменение относительной интенсивности флуоресценции пиков субстрата и продукта отражает активность фермента. Прохождение реакции определяли как отношение количества продукта к суммарному содержанию (PSR): P/(S+P), где P представляет собой высоту пика пептидного продукта, а S представляет собой

высоту пика пептидного субстрата. Реакции проводили в двух повторностях для 12 концентраций (проводили последовательные разбавления 3X, начиная с 30 мкМ). Значения IC₅₀ вычисляли при помощи 4-параметровой логистической модели.

Ферментное исследование ингибирования HDAC2 в клеточном лизате SY5Y с использованием субстрата HDAC-Glo2

[0076] Выращивание клеток и обработка ингибитором

[0077] Клетки SH-SY5Y (Sigma) выращивали в модифицированной эссенциальной среде Игла, дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой и пен./стреп. За двадцать четыре часа до введения соединения размещали по 20 мкл клеток в белые 384-луночные планшеты с плотностью 1500 клеток/луночка. Последовательно разбавляли соединения в чистом ДМСО, а затем разбавляли 1:100 (об./об.) в среде, не содержащей ЭБС, и перемешивали. Удаляли среду из помещенных в планшет клеток и добавляли соединения, разбавленные в бессывороточной среде (1% (об./об.) конечная концентрация ДМСО), и инкубировали при 37°C в течение пяти часов. Затем добавляли десять мкл реагента HDAC-Glo 2 совместно с 0,1% Triton X-100, перемешивали планшет и оставляли проявляться при комнатной температуре на 100 минут. Затем анализировали планшеты на люминометре Spectramax LMax с установленным временем интегрирования 0,4 с. Строили кривые зависимости доза-ответ при помощи нормированных данных, где значение для 100 мкМ СИ-994 принимали за 100% ингибирование, а для ДМСО за 0% ингибирование.

Исследование КОЕ эритроидных и миелоидных клеток

[0078] Проводили исследование соединений для оценки потенциального эффекта в отношении прогениторных клеток эритроидного и миелоидного ряда человека в исследованиях образования колоний клеток. Оценку клоногенных прогениторных клеток эритроидного ряда (КОЕ-Е, БОЕ-Е), гранулоцитов-моноцитов (КОЕ-GM) и мультипотентных клеток (КОЕ-GEMM) проводили в полутвердой среде на основе метилцеллюлозы, содержащей rhIL-3 (10 нг/мл), rhGM-SCF (10 нг/мл), rhSCF (50 нг/мл) и Epo (3 Ед./мл).

Клетки

[0079] Нормальные клетки костного мозга человека с низкой плотностью, выделенные из нормального костного мозга (NorCal Biologics, California) и проверенные в ReachBio,

хранили в газовой фазе в жидком азоте (-152°C) до использования в исследовании. В день эксперимента клетки быстро размораживали, содержимое каждой пробирки разбавляли в 10 мл среды Дульбекко в модификации Искова, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (IMDM + 10% ЭБС), и промывали путем центрифугирования (примерно 1200 об./мин в течение 10 минут, комнатная температура). Отбрасывали надосадочную жидкость и повторно суспендировали стустки клеток в заданном объеме IMDM + 10% ЭБС. Проводили подсчет клеток (в 3% ледяной уксусной кислоте) и оценку жизнеспособности (тест с высвобождением трипанового синего) в образце костного мозга.

Соединения

10 **[0080]** В день эксперимента соединения растворяли в ДМСО до получения маточного раствора с 10 мМ концентрацией. Проводили последовательное разбавление маточного раствора до концентраций 2 и 0,4 мМ. После добавления в среду на основе метилцеллюлозы в отношении 1:1000 (об./об.) получали конечные исследуемые концентрации 10, 2 и 0,4 мкМ. Кроме того, проводили оценку 5-FU в концентрации 1,0, 0,1 и 0,01 мкг/мл.

15 Краткое описание способа

[0081] Клоногенные прогениторные клетки эритроидного (КОЕ-Е и БОЕ-Е) и миелоидного (КОЕ-ГМ) ряда человека помещали в среду на основе метилцеллюлозы, описанную выше. В среду полностью добавляли соединения до получения конечных желаемых концентраций (10, 2 и 0,4 мкМ). 5-фторурацил (Sigma Aldrich) использовали в качестве положительного контроля пролиферации прогениторных клеток (подавление роста колоний) и вводили в культуры костного мозга человека в концентрации 1,0, 0,1 и 0,01 мкг/мл. Также готовили контрольные культуры с растворителем (не содержащие соединение, но содержащие 0,1% ДМСО), а также контроли со стандартом (не содержащие соединение и ДМСО).

25 **[0082]** Исследования прогениторных клеток миелоидного и эритроидного ряда человека начинали при наличии $2,0 \times 10^4$ клеток в культуре. После выращивания в течение 14 дней квалифицированный специалист изучал миелоидные и эритроидные колонии под микроскопом и определял их количество. Колонии разделяли на следующие категории с учетом размера и морфологии: КОЕ-Е, БОЕ-Е, КОЕ-ГМ и КОЕ-ГЕММ.

30 Статистический анализ КОК

[0083] Среднее \pm одно стандартное отклонение по трем экспериментам вычисляли для каждой категории прогениторных клеток (КОЕ-Е, БОЕ-Е, и т.д.). Двусторонние t-критерии

использовали для оценки возможных различий в количестве колоний, образующихся в контрольных культурах с растворителем и обработанных культурах. Вследствие возможной субъективности при подсчете количества колоний значение p менее 0,01 рассматривали как значимое. Для вычисления концентрации 50% подавления роста колоний (IC_{50}) для каждого соединения получали кривую зависимости доза-ответ путем построения графика зависимости уровня подавления роста колоний от логарифма концентрации соединения при помощи программного обеспечения XLfit (IDBS). Концентрацию 50% подавления роста колоний (IC_{50}) вычисляли путем подстановки в сигмоидальную кривую по формуле однофакторной модели зависимости доза-ответ: $y = A + [(B - A)/(1 + ((C/x)^D))]$, где A = начальное значение (ответ на исходном уровне), B = максимальный ответ, C = центральное значение (концентрация лекарственного средства, которая обеспечивает ответ, соответствующий среднему значению между A и B), и D = коэффициент наклона кривой в средней точке. Кроме того, графики и дополнительные кривые зависимости доза-ответ получали при помощи GraphPad Prism 7.0.

15

Морфологическая оценка колоний

[0084] Получали фотографии типовых колоний гемопоэтических прогениторных клеток различных линий, на которых были проиллюстрированы колонии в присутствии контрольного растворителя, а также колонии в присутствии исследуемых соединений.

[0085] Квалифицированный специалист проводил подсчет колоний клеток эритроидного ряда (КОЕ-Е и БОЕ-Е), миелоидного ряда (КОЕ-GM) и мультипотентных клеток (КОЕ-GEMM). Проводили анализ распределения по типам колоний, а также общей морфологии колоний и клеток. Для статистического анализа проводили сравнение числа колоний в культурах, обработанных соединением, с контрольными культурами с растворителем. В указанных исследованиях 5-FU использовали в качестве положительного контроля токсичности, и ингибирующие эффекты, полученные для данного соединения, полностью соответствовали ожиданиям. Эксперимент использовали для оценки возможного действия исследуемых соединений на пролиферацию прогениторных клеток эритроидного и миелоидного ряда человека в среде на основе метилцеллюлозы. Значения IC_{50} вычисляли при помощи XLfit. Кривые зависимости доза-ответ для определения токсичности в отношении эритроидных и миелоидных клеток получали в XLfit. Наконец

проводили подстановку в кривые методом нелинейной регрессии и вычисляли значения $IC_{50} \pm 95\%$ ДИ в Prism 7.0.-GEMM.

Исследование ингибирования CYP

5 [0086] Проводили исследование соединений для оценки их возможного ингибирующего действия в отношении CYP2D6 и CYP3A4 (мидазолам) с использованием микросом печени человека. Микросомы печени человека получали в BD Gentest, каждое соединение исследовали в двух повторностях.

10 [0087] Исследуемые соединения и контрольные ингибиторы (хинидин для 2D6, кетоконазол для 3A4) помещали в 96-луночный планшет путем переноса 8 мкл 10 мМ маточных растворов соединения в ДМСО в 12 мкл ацетонитрила. Отдельно готовили разбавленные растворы ингибиторов CYP2D6 и CYP3A4 (8 мкл маточного раствора в ДМСО добавляли в 12 мкл ацетонитрила). Затем добавляли 400 мкл 0,2 мг/мл НЛМ в исследуемые лунки, после чего в выбранные лунки добавляли 2 мкл 400 х исследуемого соединения во льду. Затем добавляли 200 мкл 0,2 мг/мл НЛМ в исследуемые лунки, после
15 чего в выбранные лунки добавляли 1 мкл растворов контрольных ингибиторов. Следующие растворы добавляли (в двух повторностях) в 96-луночный планшет для исследования во льду: Исследуемые соединения и контрольные ингибиторы (хинидин для 2D6, кетоконазол для 3A4) исследовали следующим экспериментальным способом:

20 [0088] 1. Готовили препараты исследуемого соединения и контрольных ингибиторов (400 ×) в 96-луночном планшете:

[0089] 1.1. Переносили 8 мкл 10 мМ исследуемых соединений в 12 мкл АСН.

[0090] 1.2. Готовили отдельные разбавленные растворы ингибиторов CYP3A4, CYP2D6: 8 мкл маточных растворов в ДМСО добавляли в 12 мкл АСН.

25 [0091] 2. Готовили 4 × кофактор НАДФН (66,7 мг НАДФН в 10 мл 0,1 М К-буфера, рН 7,4)

[0092] 3. Готовили 4 × субстрат (2 мл для каждой изоформы), как указано ниже в таблице (при необходимости добавляли НЛМ во льду).

[0093] 4. Готовили 0,2 мг/мл раствор НЛМ (10 мкл 20 мг/мл добавляли в 990 мкл 0,1 М К-буфера) во льду.

30 [0094] 5. Добавляли 400 мкл 0,2 мг/мл НЛМ в исследуемые лунки, а затем добавляли 2 мкл 400 х исследуемого соединения в выбранные лунки во льду.

- [0095]** 6. Добавляли 200 мкл 0,2 мг/мл НЛМ в исследуемые лунки, а затем добавляли 1 мкл раствора контрольного ингибитора в выбранные лунки во льду.
- [0096]** 7. Добавляли следующие растворы (в двух повторностях) в 96-луночный планшет для исследования во льду:
- 5 **[0097]** 7.1. Добавляли 30 мкл 2 × исследуемого соединения и контрольного соединения в 0,2 мг/мл раствор НЛМ;
- [0098]** 7.2. Добавляли 15 мкл 4× раствора субстрата.
- [0099]** 8. Предварительно инкубировали 96-луночный планшет для исследования и раствор НАФДН при 37°C в течение 5 минут.
- 10 **[00100]** 9. Добавляли 15 мкл предварительно нагретого 8 мМ раствора НАДФН в планшеты для исследования для запуска реакции.
- [00101]** 10. Инкубировали планшет для исследования при 37°C. 5 минут для 3А4, 10 минут для 2D6.
- [00102]** 11. Останавливали реакцию путем добавления 120 мкл АСН, содержащего
15 внутренний стандарт. Для СУР3А4 внутренний стандарт представлял собой 1'ОН-мидазолам-D₄ (10 мкМ раствор, разбавленный до конечной 0,1 мкМ концентрации путем добавления 100 мкл маточного раствора внутреннего стандарта в 10 мл АСН). Для СУР2D6
внутренний стандарт представлял собой 1-ОН-буфуралол-малеат-[D₉] (49 мкМ раствор, разбавленный до конечной 0,1 мкМ концентрации путем добавления 20 мкл маточного
20 раствора внутреннего стандарта в 10 мл АСН).
- [00103]** 12. После гашения реакции встряхивали планшеты на вибрационном встряхивателе (ИКА, MTS 2/4) в течение 10 минут (600 об./мин), а затем центрифугировали при 5594 g в течение 15 минут (Thermo Multifuge × 3R).
- [00104]** 13. Переносили 50 мкл надосадочной жидкости из каждой лунки в 96-луночный
25 планшет для образцов, содержащий 50 мкл ультра-чистой воды (Millipore, ZMQS50F01) для анализа ЖХ/МС.
- [00105]** Оценку ингибирования изоформ СУР проводили на основании результатов исследования следующим образом: уровень ингибирования СУР более 50% соответствовал высокоактивному ингибированию; уровень ингибирования СУР в 30 - 50% соответствовал
30 незначительному ингибированию; уровень ингибирования СУР менее 30% соответствовал незначительному ингибированию или его отсутствию. Уровень ингибирования СУР менее

-30% указывал на то, что соединение обеспечивало в некоторой степени активацию данной изоформы.

Измерение кинетики растворения в водных растворах

[00106] Проводили оценку кинетики растворения соединений в буфере или воде. Аликвоты по 8 мкл маточных растворов стандарта и исследуемого соединения (10 мМ в ДМСО) добавляли в 792 мкл 100 мМ фосфатного буфера (0,1 М NaPO_4 , pH 7,4). Конечная концентрация ДМСО составляла 1%. Пробирки с образцами встряхивали в течение 1 часа (1000 об./мин) при комнатной температуре. Строили калибровочную кривую с использованием 300 мкМ разбавленного раствора (SS) в MeOH/ACN (4:1) (SS = добавляли 6 мкл 10 мМ соединения в 194 мкл MeOH/ACN (4:1)). Центрифугировали образцы в течение 10 минут (12000 об./мин) для осаждения нерастворенных частиц и переносили надосадочные жидкости в новую пробирку или планшет. Надосадочные жидкости разбавляли в 10 раз и 100 раз в 100 мМ буфере. Затем готовили образцы для анализа путем ЖХ-МС/МС (Добавляли 5 мкл образцов соединений (не разбавленное, разбавленное в 10 раз и разбавленное в 100 раз) и образцов стандартов для построения кривой в 95 мкл ACN, содержащего внутренний стандарт. В качестве внутренних стандартов использовали пропранолол, кетоконазол и тамоксифен.

Оценка концентрации в мозге и плазме после внутривенного (в.в.) и перорального (п.о.) введения соединений мышам

[00107] Соединения вводили мышам в дозах 10 мг/кг или 30 мг/кг п.о. и 1 мг/кг в.в. У трех животных отбирали пробы для анализа плазмы в каждый момент времени путем отбора проб крови через 0,25, 0,5, 1, 4, 12 и 24 часа. Терминальный отбор крови для анализа плазмы и сбор образцов мозга проводили через 0,25, 0,5, 1, 4, 12 и 24 часа (также использовали по три животных для каждого момента определения концентрации в мозге). Всего использовали шесть временных интервалов для анализа плазмы и шесть временных интервалов для анализа мозга.

[00108] Сбор образцов:

[00109] Плазма: Животных удерживали руками в заданные моменты времени, собирали примерно 150 мкл крови/временной интервал в пробирку с $\text{K}_2\text{ЭДТА}$ путем ретроорбитальной пункции или сердечной пункции под изофлурановой анестезией. Образец крови центрифугировали (2000 g, 4°C, 5 мин) для получения плазмы в течение 30 минут после отбора крови.

5 [00110] Мозг: В заданные моменты времени делали срединный разрез на скальпе животного и отгибали кожу. При помощи небольших костных скальпелей и кусачек удаляли фрагмент черепа, покрывающий мозг. Удаляли мозг при помощи шпателя и промывали холодным солевым раствором. Помещали мозг в пробирки с завинчивающимися крышками, а затем хранили пробирки при -70°C до проведения анализа.

Определенные преимущества соединений 1 и 2

10 [00111] При разработке лекарственных средств важно, чтобы соединения имели приемлемые для лекарственных средств профили разнообразных параметров. Как правило, соединения изучают не только по активности *in vitro*, но также в рамках предсказательных исследований всасывания, распределения, выведения и метаболизма (ADME) *in vitro* и экспериментов по определению фармакокинетики (PK) *in vivo*. В некоторых случаях соединения также изучают в рамках предсказательных исследований безопасности *in vitro*. Сбор данных ADME и безопасности *in vitro*, а также данных PK помогает выявлять преимущества определенных структурных отличительных признаков и позволяет
15 оптимизировать взаимосвязь структура-активность (SAR) для разработки соединений с оптимизированными профилями лекарственных средств для их изучения *in vivo*. Предложенные соединения не только обеспечивают преимущество гематологической безопасности, то также в целом обладают сбалансированными профилями активности, ADME и PK.

20 [00112] Соединения на основе аминоканилинмочевины, такие как **соединение сравнения А** и **соединение сравнения В**, приведенные в **таблице 2**, были описаны ранее в WO 2017/007755 и WO 2017/007756 (содержание каждой из которых включено в настоящую заявку посредством ссылки). Во время скрининга в исследовании колониеобразующих единиц (КОЕ) *in vitro* с использованием клеток костного мозга человека при изучении
25 прогениторных клеток эритроидного и миелоидного ряда (которые позволяют предсказывать нейтропению) и сравнении с соответствующим аналогом, **соединением сравнения В** на основе диаминопиридинмочевины, можно увидеть, что замена одного атома в ядре диаминопиридинмочевины, как в **соединении сравнения В**, приводит к значительному улучшению предполагаемой безопасности в отношении эритроидных и
30 миелоидных клеточных линий по сравнению с мочевиной в аминоканилиновом остове в **соединении сравнения А**. См. **таблицу 2**. Кроме того, если заменить 4-фторфенильную группу в **соединении сравнения В** на тиофеновую группу (**соединение сравнения С**), но сохранить пиразолопиразинный компонент мочевины, то можно добиться схожего улучшения предполагаемого профиля безопасности по сравнению с **соединением**

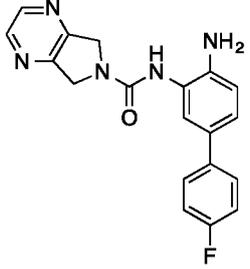
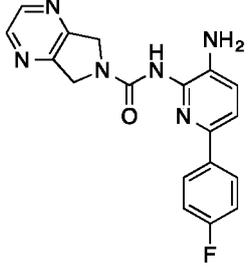
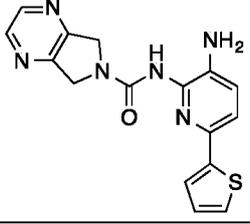
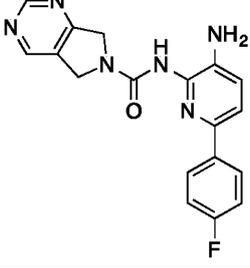
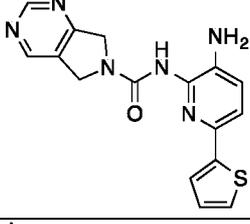
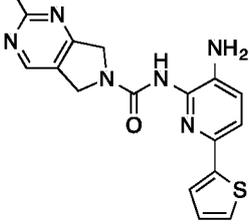
сравнения А на основе аминоканилинмочевины. Это является доказательством того, что мочевины в диаминопиридиновых соединениях, имеющих идентичные пирролидиновые компоненты мочевины, являются более безопасными по сравнению с соответствующими аминоканилинмочевинами.

5 **[00113]** Несмотря на то, что для соединений на основе пирролопиразинмочевины, **соединения сравнения В** и **соединения сравнения С**, была показана хорошая активность в исследования активности *in vitro*, их результаты в исследовании КОЕ *in vitro* могли бы быть лучше. Значение IC₅₀ в отношении миелоидной клеточной линии >5 мкМ (что примерно соответствует >30% оставшихся колоний при концентрации 10 мкМ) позволяет
10 предположить низкую вероятность клинической нейтропении, таким образом, это является желательным пороговым значением для приемлемой безопасности (см.: Pessina *et al. Toxicological Sciences* **2003**, 75, 355-367; Clarke *et al. Gen. Eng. & Biotech. News* **2010**, 14-15.). Было обнаружено, что за счет изменения пирролопиразина на пирролопиримидин можно добиться значительного улучшения профиля безопасности *in vitro*. При сравнении
15 схожих аналогов, **соединения сравнения В** (пирролопиразин) и **соединения сравнения D** (пирролопиримидин), наблюдали значительное улучшение уровня КОЕ для прогениторных клеток эритроидного и миелоидного ряда. Такая же тенденция сохраняется для схожих аналогов на основе аминоканилинмочевины, содержащих тиофеновый карман, **соединения сравнения С** (пирролопиразин) и **соединения сравнения Е** (пирролопиримидин).
20 Несмотря на то, что наличие пиримидина улучшало профиль безопасности, для обоих незамещенных пиримидиновых соединений, **соединения сравнения D** и **соединения сравнения Е**, наблюдали значительное ингибирование CYP2D6 в 10 мкМ концентрации. Тем не менее, после введения заместителя в пиримидиновое кольцо между атомами азота, в **соединении 2** (метил-замещенный пирролопиримидин) не наблюдали значительное
25 ингибирование ни CYP2D6, ни CYP3A4 в 10 мкМ концентрации.

[00114] Эти результаты подтверждают, что незначительные химические модификации, такие как смещение атома азота на одно положение в кольце, как в **соединениях сравнения В** и **D**, и замена водорода на метил (как в **соединениях сравнения Е** и **соединении 2**) обеспечивают значительное улучшение безопасности.

30 **Таблица 2. Сравнение профилей *in vitro* соединения 2 и различных соединений сравнения**

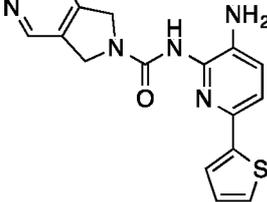
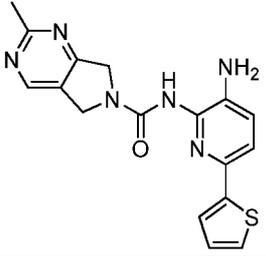
Соед	Структура	IC ₅₀ в иссл. клеточного	IC ₅₀ фермент. иссл.	Ингиб., %, CYP	% ост. КОЕ относит. контроля при 10 мкМ
------	-----------	-------------------------------------------	------------------------------------	-------------------	-----------------------------------------------

		лизата HDAC2 SY5Y (мкМ)	рекомбинант. HDAC (мкМ)		при 10 мкМ:		Erythroid	Myeloid
			HDAC2	HDAC1	2D6	3A4		
A		0,369	0,142	0,027	34	-22	0	0
B		0,485	0,475	0,119	9	1,5	9	25
C		0,279	0,301	0,095	0,2	1	20	20
D		0,331	0,627	0,239	85	2	47	84
E		0,278	0,511	0,142	50	-17	54	83
2		0,577	0,434	0,133	-5	1	27	59

[00115] Помимо улучшения профиля ингибирования СУР в пирролопиримидиновых соединениях при введении заместителя между атомами азота в пиримидине **соединение 2** также имело улучшенный профиль РК по сравнению с незамещенным **соединением**

сравнения Е. См. таблицу 3. Метил-пиримидин в соединении 2 обеспечивает выраженные преимущества РК по сравнению с незамещенным пиримидиновым аналогом, выражающиеся в увеличении периода полувыведения, пониженном клиренсе, повышенной биодоступности и увеличением концентрации в мозге >5 раз. Эти результаты 5 подтверждают, что незначительные химические модификации также приводят к значительным преимуществам РК.

Таблица 3. Сравнение профилей РК незамещенных пиримидиновых и метил-пиримидиновых аналогов.

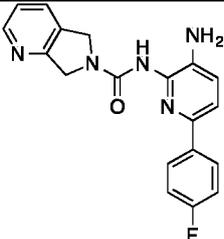
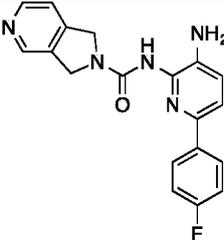
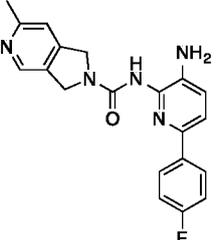
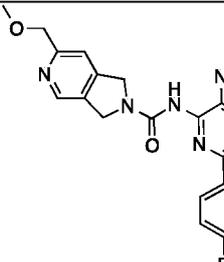
	Соединение сравнения Е	Соединение 2
Структура		
в.в. мышам (1 мрк): T1/2 (ч)	0,152	0,839
в.в. мышам (1 мрк): Cl (л/ч/кг)	8,33	4,18
в.в.-п.о. мышам (1/10 мрк): F (%)	49	100
п.о. мышам (1/10 мрк): T1/2 (ч)	0,557	1,05
п.о. мышам (10 мрк): Cmax в мозге (нг/г) (своб. Cmax, нг/г)	100	583
п.о. мышам (10 мрк): своб. Cmax в мозге (нг/г)	35	173

[00116] Схожие преимущества были получены при изучении региоизомеров и различных профилей заместителей пирролопиридинмочевины в диаминопиридинах. Например, 10 несмотря на то, что для пирролопиридинового соединения сравнения F наблюдали хорошую активность *in vitro*, оно с высокой активностью ингибировало CYP2D6 и имело крайне низкую растворимость. См. таблицу 4. Как было показано, перемещение атома азота пиридина в пирролопиридине (соединение сравнения G) улучшает растворимость. 15 Тем не менее, сохранялся высокий уровень ингибирования как CYP2D6, так и CYP3A4. Было обнаружено, что встраивание метилового заместителя по соседству с атомом азота пиридина в пирролопиридине в некоторой степени улучшало профили ингибирования CYP 2D6 и 3A4, при этом сохранялись активность и растворимость (соединение сравнения H). Встраивание электроноакцепторной метоксиметилового группы по соседству с атомом азота 20 пиридина (соединение сравнения H) еще больше улучшало профили ингибирования CYP

2D6 и 3A4, и снова при этом сохранялись желаемые профили активности и растворимости. Схожие результаты наблюдались при сравнении монофторидных и дифторидных аналогов, **соединения сравнения I** и **соединения 1**, где для **соединения 1** наблюдали слегка пониженную растворимость. См. **таблицу 4**.

5 [00117] Тем не менее, **соединение 1** намного превосходило **соединение сравнения I** с точки зрения безопасности *in vitro*, несмотря на то, что они различались только дополнительным атомом галогена. См. **таблицу 5**. Обработка прогениторных клеток эритроидного и миелоидного ряда 2,4-дифторзамещенным **соединением 1** обеспечивала значительные преимущества по сравнению с **соединением сравнения I**.

10 **Таблица 4. Сравнение профилей *in vitro* соединения 1 с различными соединениями сравнения.**

Соед	Структура	IC50 в исслед. лизата HDAC2 SY5Y (мкМ)	IC50 в фермент. иссл. рекомб. HDAC (мкМ)		Ингиб., %, СУР при 10 мкМ:		Раств-ть (мкМ)
			HDAC 2	HDAC 1	2D6	3A4	
F		0,394	0,304	0,079	62	-4	1
G		0,639	0,335	0,143	94	65	55
H		0,621	0,214	0,090	57	28	78
I		0,666	0,276	0,122	2	33	121

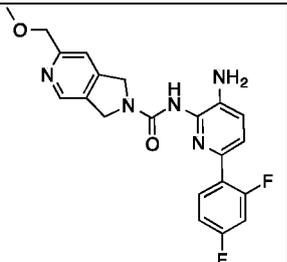
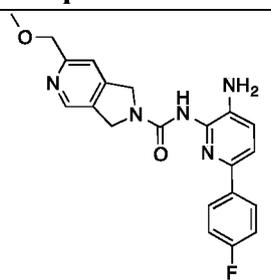
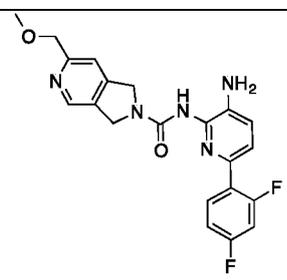
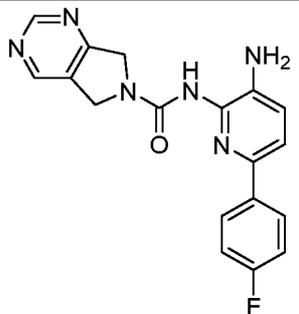
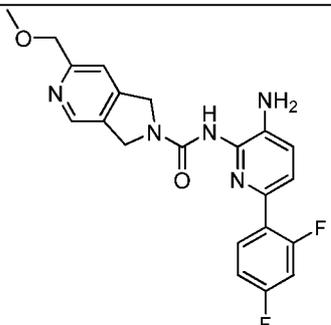
1		0,777	0,510	0,326	-1	27	27
----------	-----------------------------------------------------------------------------------	-------	-------	-------	----	----	----

Таблица 5. Данные исследования КОЕ *in vitro* для соединения 1 и соединения сравнения I

	Соединение сравнения I	Соединение 1
Структура		
% ост. КОЕ относительно контроля при 10 мкМ: эритроидные клетки	23	57
% ост. КОЕ относительно контроля при 10 мкМ: миелоидные клетки	59	86

[00118] Ниже в **таблице 6** показаны значения концентрации в мозге и плазме после внутривенного (в.в.) и перорального (п.о.) введения соединений мышам.

Таблица 6

	Структура	Прогн. Стах в мозге при 10 трк, нг/г (*пересч. для сравнения)	Прогн. своб. Стах в мозге при 10 трк, мкМ (*пересч. для сравнения)	в.в. РК T ½ (ч)	в.в. РК Cl (л/ч/кг)
Соединение сравнения D		158*	0,111*	Нет данных	Нет данных
1		2460	1,04	2,13 п.о. = 1,97	0,681

Влияние 14-дневного перорального введения низких доз соединений на морфологию дендритных шипиков в дорсальном гиппокампе (CA1) мышей дикого типа

5

[00119] Проводили оценку соединений для определения возможных изменений морфологии дендритных шипиков в области CA1 дорсального гиппокампа у мышей дикого типа (WT) при субхроническом введении. Соединения вводили перорально мышам дикого типа ежедневно в течение 14 дней. Дозы выбирали на основании данных фармакокинетики, концентрации в мозге и активности. Затем проводили оценку влияния введения соединений на морфологию дендритных шипиков в области CA1 дорсального гиппокампа.

10

Способы: на живых животных

15

[00120] Самцам мышей C57BL/6J (7-8 недель, n=7 в группе) перорально вводили соединения, предложенные Rodin, или носитель (20% HPBCD) ежедневно в течение 14 дней. Дозы соединений выбирали на основании данных о концентрации, полученных в экспериментах для определения фармакокинетики. Дозы некоторых соединений подбирали

для определения неэффективных доз в рамках продолжения предыдущих исследований, в которых было показано увеличение плотности дендритных шипиков после введения **соединения 2** (в дозах 1, 3, 6 и 20 мг/кг/день), **соединения 1** (10 мг/кг/день). Мышей умерщвляли через 24 часа после введения последней дозы и проводили транскардиальную перфузию для подготовки образцов мозга.

Способ перфузии и сбора образцов мозга

[00121] Мышей анестезировали хлоральгидратом (4% хлоральгидрата в солевом растворе, 10 мл/кг), после чего проводили транскардиальную перфузию 4% PFA в 1X ФБР (рН 7,4, комнатная температура) со скоростью 20 мл/мин в течение 54 секунд. Сразу после инфузии мышей умерщвляли декапитацией и извлекали мозг. Затем фиксировали мозг в сцинтилляционных пробирках, содержащих 4% PFA (5-10 мл) в течение 4 минут. Делали срезы мозга с использованием тканевого вибратора (Leica VT1000) для получения срезов (толщиной 300 мкм) от переднего и до заднего края каждого мозга.

Введение баллистической метки красителя и микроскопия

[00122] Проводили лазерную сканирующую конфокальную микроскопию со сверхвысоким разрешением (Zeiss LSM880, Airyscan) с использованием 63X объектива (1,42 NA) для сканирования отдельных меченных нейронов с высоким разрешением (разрешение сканов = 0,06 мкм/пиксель; осевое разрешение = 0,06 мкм/шаг фокуса). Нейронные мишени выявляли в рассматриваемой области мозга путем, основываясь на данных эпифлуоресценции с учетом анатомического расположения и морфологии клеток. Микроскопию проводили после заслепления условий эксперимента. Каждое экспериментальное условие исследовали как минимум на 7 мышах. Каждый сегмент изучали как минимум на 5 образцах у каждой мыши (диапазон = 5 – 6).

Анализ дендритных шипиков ESP и оценка целостности дендритной мембраны

[00123] Проводили слепую деконволюцию (AutoQuant) исходных трехмерных цифровых изображений, которые затем изучали квалифицированные специалисты для определения плотности и морфологии шипиков. Вручную измеряли следующие параметры отдельных шипиков (a) диаметр головки, (b) длину и (c) толщину шейки по данным карты срезов по оси Z при помощи специально созданного программного обеспечения Afracis ESP. Анализ каждого дендрита проводили 3 (в среднем) независимых специалиста. Программное обеспечение для автоматического распределения изображений случайным образом пересылало изображения специалистам таким образом, чтобы каждый специалист проводил измерение практически равного количества дендритов из каждой группы.

5 Специалисты были заслеплены относительно всех экспериментальных условий (включая способ лечения, область мозга и тип клеток). Проводили оперативный статистический анализ изменчивости результатов между специалистами для каждого дендрита, который использовали для исключения дендритов, которые не удовлетворяли критериям достоверности результатов, полученных различными специалистами: В случае плотности шипиков и классификации морфологии шипиков определяли средние значениями, полученные специалистами, и указывали данные для каждого дендрита.

Параметры образцов дендритов:

dHIPР, CA1 апикальный, 2° (0 - 50 мкм):

10 Область мозга: дорсальный гиппокамп (dHIPР)

Тип клеток: CA1 пирамидальный нейрон (CA1)

Тип разветвления: апикальное

Порядок разветвления: вторичное (2°)

Расположение образца: 0 - 50 мкм от места разветвления

15 **[00124]** У каждого выявленного дендритного шипика измеряли (а) длину шипика, (b) диаметр головки шипика и (с) ширину шейки. Распределение совокупности значений каждого параметра составляли для каждого образца дендрита и объединяли по группам. Исходные морфометрические параметры дендритных шипиков (длину шипика, диаметр головки, ширину шейки) объединяли в виде схемы, которую использовали для описания классических фенотипов шипиков (например, грибовидные, пеньковые и т.д.). Общую плотность шипиков также указывали как сумму плотностей всех подклассов.

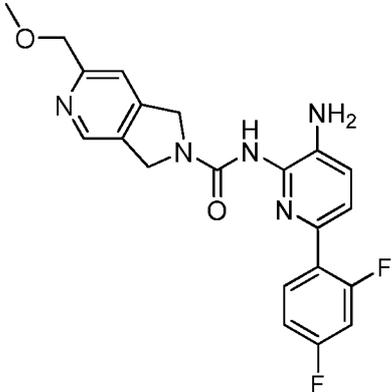
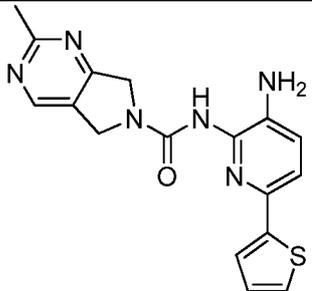
Результаты:

25 **[00125]** Общий наблюдения. При обработке тканей не наблюдали факторы патологий, включая аномальное разрушение соматических мембран, пузырение дендритов или аномальные модификации диаметра дендритов изучаемых типов клеток или других типов клеток в исследуемых областях мозга. Для достоверного сравнения способов исследования данные об общей плотности шипиков нормировали по уровню относительно носителя в %

$$1) \% \text{ отн. носителя} = \frac{\text{(Плотность шипиков или точек SV2A)}}{\text{(Средняя плотность шипиков или точек SV2A для носителя)}} \times 100$$

30 Данные указывали как среднее +/- СОС общей плотности шипиков (увеличение в % относительно носителя). Результаты приведены в **таблице 7.**

Таблица 7. Влияние 14-дневного введения на морфологию шипиков у мышей WT.

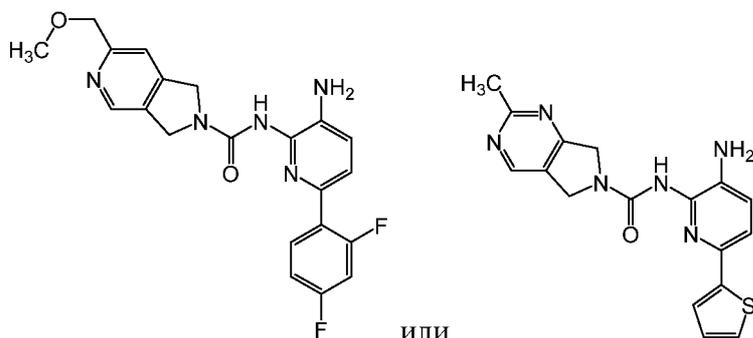
Соединение	Структура	Доза (мг/кг)	Шипики, всего (увел. в % отн. носителя)	Тонкие шипики (увел. в % отн. носителя)
1		0,1	12,2	13,8
		0,3	21,3*	23,2*
		1	34,6*	45,1*
		3	26,7*	25,3*
		10	25,1*	19,9*
2		0,1	8,1	11,3
		1	21,4*	21,2
		3	24,7*	32,2*
		6	15*	35,4*
		20	-0,12	37,4*

*значительное различие по сравнению с носителем, $p < 0,05$ согласно однофакторному ANOVA и последующему вторичному анализу Даннетта

5 **[00126]** Содержание всех документов (включая литературные источники, выданные патенты, опубликованные заявки на патент и одновременно рассматриваемые заявки на патент), упоминаемых в настоящей заявке, явным образом включено в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылок. Если отсутствуют иные определения, то все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, соответствуют значениям, общепринятым в данной области техники.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы:



или его фармацевтически приемлемая соль.

- 5 2. Композиция, содержащая соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель.
3. Способ ингибирования активности деацетилаз гистонов (HDAC) у субъекта, включающий стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения по п.1, или его фармацевтически приемлемой соли, или композиции по п.2.
- 10 4. Способ лечения состояния у субъекта, выбранного из неврологического расстройства, расстройства или ухудшения памяти или когнитивной функции, нарушения, связанного с угасанием навыков (disorder of learning extinction), грибкового заболевания или инфекции, воспалительного заболевания, гематологического заболевания, психиатрических расстройств и неопластического заболевания, включающий введение
- 15 субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения по п.1, или его фармацевтически приемлемой соли, или композиции по п.2.
5. Способ по п.4, отличающийся тем, что указанное состояние представляет собой:
- а. расстройство или ухудшение когнитивной функции, связанное с болезнью Альцгеймера, болезнью Хантингтона, потерей памяти, вызванной эпилептическим
- 20 припадком, шизофренией, синдромом Рубинштейна-Тейби, синдромом Ретта, депрессией, ломкой X-хромосомой, деменцией с тельцами Леви, сосудистой деменцией, лобно-височной дегенерацией (лобно-височной деменцией, ЛВД), ЛВД-GRN (лобно-височной деменцией с мутациями в гене GRN), СДВГ, дислексией, биполярным расстройством, и социальные, когнитивные расстройства и расстройства нарушения обучения, связанные с
- 25 аутизмом, травматическим повреждением головы, расстройством дефицита внимания, тревожным расстройством, условно-рефлекторной реакцией страха, паническим

- расстройством, обсессивно-компульсивным расстройством, посттравматическим стрессовым расстройством (PTSD), фобией, социальным тревожным расстройством, восстановлением после лекарственной зависимости, возрастным нарушением памяти (ААМІ), возрастным снижением когнитивных функций (ARCD), атаксией, болезнью Паркинсона или деменцией при болезни Паркинсона; или
- 5
- b. гематологическое заболевание, выбранное из острого миелоидного лейкоза, острого промиелоцитарного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического миелогенного лейкоза, миелодиспластических синдромов и серповидноклеточной анемии; или
- 10
- c. неопластическое заболевание; или
- d. нарушение, связанное с угасанием навыков, выбранное из угасания, вызванного страхом, и посттравматического стрессового расстройства.
- б. Способ по п.5, отличающийся тем, что указанное состояние представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, лобно-височную деменцию, атаксию Фридрейха, посттравматическое стрессовое расстройство (PTSD), болезнь Паркинсона или
- 15
- восстановление после лекарственной зависимости.