

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036639**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.02

(21) Номер заявки
201492050

(22) Дата подачи заявки
2013.05.09

(51) Int. Cl. **C07D 403/12** (2006.01)
C07D 413/12 (2006.01)
C07D 249/08 (2006.01)

(54) **МОДУЛЯТОРЫ ЯДЕРНОГО ТРАНСПОРТА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **61/644,802; 61/798,188**

(32) **2012.05.09; 2013.03.15**

(33) **US**

(43) **2015.07.30**

(86) **PCT/US2013/040404**

(87) **WO 2013/170068 2013.11.14**

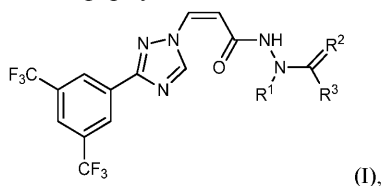
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БАЙОДЖЕН МА ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Санданаяка Винсент П., Шектер
Шэрон, Шачам Шэрон, Макколи
Дилара, Балоглу Эркан (US)**

(74) Представитель:
Лыу Т.Н., Угрюмов В.М. (RU)

(56) **WO-A1-2011109799
WO-A1-2013019548**

(57) Изобретение относится к соединениям формулы I



и их фармацевтически приемлемым солям, фармацевтическим композициям, содержащим соединения формулы I, и способам применения указанных соединений, солей и композиций в лечении различных нарушений, связанных с активностью CRM1.

B1**036639****036639****B1**

Родственные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 61/644802, поданной 9 мая 2012 г., и предварительной заявкой на выдачу патента США № 61/798188, поданной 15 марта 2013 г. Полное содержание вышеупомянутых заявок включено в настоящий документ посредством ссылки.

Уровень техники

Клетки из большинства крупных солидных и гематологических злокачественных опухолей человека проявляют аномальную клеточную локализацию разнообразных онкогенных белков, белков-супрессоров опухолевого роста и регуляторов клеточного цикла (Cronshaw et al., 2004, Falini et al., 2006). Например, определенные мутации p53 приводят к локализации в цитоплазме вместо локализации в ядре. Это приводит к потере нормальной регуляции роста, несмотря на интактную функцию опухолевого супрессора. В других опухолях p53 дикого типа изолируется в цитоплазме или быстро разлагается, снова приводя к потере его супрессорной функции. Восстановление соответствующей ядерной локализации функционального белка p53 может нормализовать некоторые свойства опухолевых клеток (Cai et al., 2008; Hoshino et al., 2008; Lain et al., 1999a; Lain et al., 1999b; Smart et al., 1999), может восстановить чувствительность злокачественных клеток к повреждающим ДНК средствам (Cai et al., 2008) и может привести к регрессии развившихся опухолей (Sharpless & DePinho 2007, Xue et al., 2007). Аналогичные данные были получены для других белков-супрессоров опухолевого роста, таких как forkhead (Turner and Sullivan 2008) и c-Abl (Vignari and Wang 2001). Кроме того, аномальная локализация некоторых белков-супрессоров опухолевого роста и регуляторов роста может быть вовлечена в патогенез аутоиммунных заболеваний (Davis 2007, Nakahara 2009). Ингибирование CRM1 может обеспечивать представляющую особый интерес применимость при наследственных раковых синдромах (например, синдроме Ли-Фраумени вследствие потери одного аллеля p53, раковых синдромах BRCA1 или 2), при которых специфические белки-супрессоры опухолевого роста (TSP) удалены или дисфункциональны и при которых повышенное содержание TSP путем системного (или местного) введения ингибиторов CRM1 может помочь восстановить нормальную функцию супрессоров опухолевого роста.

Специфические белки и РНК переносятся в ядро и из него с помощью специализированных транспортных молекул, которые классифицируются как импортины, если они транспортируют молекулы в ядро, и экспортины, если они транспортируют молекулы из ядра (Terry et al., 2007; Sorokin et al., 2007). Белки, которые транспортируются в ядро или из него, содержат последовательности ядерного импорта/локализации (NLS) или экспорта (NES), которые обеспечивают их взаимодействие с соответствующими транспортерами. Chromosomal region maintenance 1 (Crm1), который также называется экспортин-1 или Xpo1, представляет собой главный экспортин.

Сообщалось об избыточной экспрессии Crm1 в нескольких видах опухолей, включая в себя рак яичника человека (Noske et al., 2008), рак шейки матки человека (van der Watt et al., 2009), рак поджелудочной железы человека (Huang et al., 2009), гепатоклеточную карциному человека (Pascale et al., 2005) и остеосаркому человека (Yao et al., 2009), и она независимо коррелировала с плохими клиническими исходами в указанных типах опухолей.

Ингибирование Crm1 блокирует массовый выход белков-супрессоров опухолевого роста и/или регуляторов роста, таких как белки p53, c-Abl, p21, p27, pRB, BRCA1, IκB, ICp27, E2F4, KLF5, YAP1, ZAP, KLF5, HDAC4, HDAC5 или forkhead (например, FOXO3a), из ядра, которые ассоциированы с экспрессией генов, клеточной пролиферацией, ангиогенезом и эпигенетикой. Было показано, что ингибиторы Crm1 индуцируют апоптоз в злокачественных клетках даже в присутствии активирующих онкогенных или стимулирующих рост сигналов, при этом щадя нормальные (нетрансформированные) клетки. Большинство исследований ингибирования Crm1 использовали природный продукт - ингибитор Crm1, лептомицин В (LMB). Сам по себе LMB является высокотоксичным по отношению к опухолевым клеткам, но плохо переносится животными (Roberts et al., 1986) и людьми (Newlands et al., 1996) в связи со значительной токсичностью в отношении желудочно-кишечного тракта. Дериватизация LMB для улучшения лекарственных средств дает в результате соединения, которые сохраняют противоопухолевую активность и лучше переносятся в животных опухолевых моделях (Yang et al., 2007, Yang et al., 2008, Mutka et al., 2009). Следовательно, ингибиторы ядерного экспорта могут характеризоваться благоприятными эффектами на опухолевые и другие пролиферативные нарушения. К настоящему времени, тем не менее, низкомолекулярные, подобные лекарственным средствам ингибиторы Crm1 для применения *in vitro* и *in vivo* являются редкими.

В дополнение к белкам-супрессорам опухолевого роста Crm1 также экспортирует некоторые ключевые белки, которые вовлечены во многие воспалительные процессы. Они включают в себя IκB, NF-κB, Cox-2, RXRα, Commd1, HIF1, HMGB1, FOXO, FOXF и др. Семейство ядерных факторов каппа В (NF-κB/rel) активаторов транскрипции, названное в честь открытия, что оно управляет экспрессией гена иммуноглобулина каппа, регулирует экспрессию мРНК разнообразных генов, вовлеченных в воспаление, пролиферацию, иммунитет и клеточную выживаемость. При базальных условиях белковый ингибитор NF-κB, называемый IκB, связывается с NF-κB в ядре, и комплекс IκB-NF-κB делает транскрипционную

функцию NF-κB неактивной. В ответ на воспалительные стимулы IκB диссоциируется от комплекса IκB-NF-κB, который высвобождает NF-κB и демаскирует его транскрипционную активность. Многие сигналы, которые активируют NF-κB, делают это путем нацеливания IκB на протеолиз (фосфорилирование IκB делает его "пригодным" для убиквитинилирования и затем протеолиза). Ядерный комплекс IκBα-NF-κB затем экспортируется в цитоплазму с помощью Crm1, где они диссоциируются, и активность NF-κB может быть восстановлена. Убиквитинилированный IκB также может диссоциироваться от комплекса NF-κB, восстанавливая транскрипционную активность NF-κB. Ингибирование индуцированного Crm1 экспорта в нейтрофилах и макрофагоподобных клетках человека (U937) с помощью LMB не только приводит к накоплению транскрипционно неактивного ядерного комплекса IκBα-NF-κB, но также предотвращает начальную активацию NF-κB даже при клеточной стимуляции (Ghosh, 2008, Huang, 2000). В другом исследовании обработка с помощью LMB ингибировала индуцированное IL-1β связывание ДНК NF-κB (первую стадию в транскрипционной активации NF-κB), экспрессию IL-8 и экспрессию молекул межклеточной адгезии в эндотелиальных клетках капилляров легких (Walsh, 2008). COMMD1 представляет собой другой ядерный ингибитор транскрипционной активности как NF-κB, так и индуцируемого гипоксией фактора 1 (HIF1). Блокирование ядерного экспорта COMMD1 путем ингибирования Crm1 приводит к повышенному ингибированию транскрипционной активности NF-κB и HIF1 (Muller, 2009).

Crm1 также опосредует транспорт ретиноидного X рецептора α (RXRα). RXRα экспрессируется на высоком уровне в печени и играет центральную роль в регуляции метаболизма желчных кислот, холестерина, жирных кислот, стероидов и ксенобиотиков, а также гомеостаза. Во время воспаления печени содержание ядерного RXRα существенно снижается, главным образом, вследствие опосредованного воспалением ядерного экспорта RXRα с помощью Crm1. Lep B способен предотвратить индуцированный IL-1β цитоплазматическое увеличение содержания RXRα в происходящих из печени клеток человека (Zimmerman, 2006).

Роль опосредованного Crm1 ядерного экспорта в передаче сигналов NF-κB, HIF-1 и RXRα указывает на то, что блокирование ядерного экспорта может быть потенциально благоприятным во многих воспалительных процессах во многих тканях и органах, включая в себя сосудистую систему (васкулит, артериит, ревматическая полимиалгия, атеросклероз), дерматологические (см. выше), ревматологические состояния (ревматоидный и связанный с ним артрит, псориатический артрит, спондилоартропатии, кристаллические артропатии, системная красная волчанка, смешанное заболевание соединительной ткани, синдромы миозита, дерматомиозит, миозит с включенными тельцами, недифференцированное заболевание соединительной ткани, синдром Шегрена, склеродермия и перекрывающиеся синдромы т.д.).

Ингибирование CRM1 воздействует на экспрессию генов путем ингибирования/активации серии транскрипционных факторов, например ICp27, E2F4, KLF5, YAP1, ZAP.

Ингибирование Crm1 характеризуется потенциальными терапевтическими эффектами на многие дерматологические синдромы, включая в себя воспалительные дерматозы (атопический, аллергический дерматит, химический дерматит, псориаз), вызванное солнечными лучами повреждение (повреждение ультрафиолетовыми лучами/УФ повреждение) и инфекции. Ингибирование CRM1, лучше всего изученное с помощью LMB, показало минимальные эффекты на нормальные кератиноциты и проявило противовоспалительную активность на кератиноциты, подвергнутые воздействию УФ, TNFα или других воспалительных стимулов (Kobayashi & Shinkai 2005, Kannan & Jaiswal 2006). Ингибирование Crm1 также положительно регулирует активность NRF2 (ядерного фактора 2, родственного эритроидному фактору), который защищает кератиноциты (Schafer et al., 2010, Kannan & Jaiswal, 2006) и другие типы клеток (Wang et al., 2009) от окислительного повреждения. LMB индуцирует апоптоз в кератиноцитах, инфицированных онкогенными штаммами папилломавируса человека (HPV), такими как HPV16, но не в неинфицированных кератиноцитах (Jolly et al., 2009).

Crm1 также опосредует транспорт ключевых нейропротекторных белков, которые могут быть применимы при нейродегенеративных заболеваниях, включая в себя болезнь Паркинсона (PD), болезнь Альцгеймера и амиотрофический латеральный склероз. Например, (1) принудительно удерживая в ядре такие ключевые нейропротекторные регуляторы, как NRF2 (Wang, 2009), FOXA2 (Kittappa et al., 2007), задерживая в нейрональных клетках и/или (2) ингибируя транскрипционную активность NFκB путем изолирования IκB в ядре в глиальных клетках, ингибирование Crm1 могло замедлить или предотвратить гибель нейрональных клеток, наблюдаемую при указанных нарушениях. Также существует доказательство связи аномальной пролиферации глиальных клеток с аномалиями в содержании CRM1 или функции CR1 (Shen, 2008).

Интактный ядерный экспорт, главным образом опосредованный CRM1, также необходим для интактного созревания многих вирусов. Вирусы, у которых ядерный экспорт и/или сам по себе CRM1 был вовлечен в их жизненный цикл, включают в себя вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), аденовирус, ретровирус типа 1 обезьян, вирус болезни Борна, грипп (обычные штаммы, а также H1N1 и штаммы птичьего H5N1), вирусы гепатита В (HBV) и С (HCV), папилломавирус человека (HPV), респираторно-синцитиальный вирус (RSV), денге, коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома, вирус

желтой лихорадки, вирус лихорадки Западного Нила, вирус простого герпеса (HSV), цитомегаловирус (CMV) и полиомавирус клеток Меркеля (MCV). (Bhuvanankantham, 2010, Cohen, 2010, Whittaker, 1998). Предполагается, что дополнительные вирусные инфекции, находящиеся в зависимости от интактного ядерного экспорта, будут открыты в ближайшем будущем.

Белок HIV-1 Rev, который осуществляет транспорт через ядро и движется вперед-назад между ядром и цитоплазмой, облегчает экспорт несплайсированных и сплайсированных по отдельности транскриптов ВИЧ, содержащих РНК элементов, связывающихся с Rev (RRE) с помощью экспортного пути CRM1. Ингибирование опосредованного Rev транспорта РНК с применением таких ингибиторов CRM1, как LerV или PKF050-638, может остановить процесс транскрипции ВИЧ-1, ингибировать продукцию новых вирионов ВИЧ-1 и, тем самым, снизить содержание ВИЧ-1 (Pollard, 1998, Daelemans, 2002).

Вирус денге (DENV) представляет собой возбудителя распространенного артропозного вирусного заболевания, лихорадки денге (DF) и более тяжелой и потенциально смертельной опасной геморрагической лихорадки денге (DHF). DHF, по-видимому, является результатом избыточного воспалительного ответа на DENV. NS5 представляет собой самый крупный и наиболее консервативный белок DENV. CRM1 регулирует транспорт NS5 из ядра в цитоплазму, где опосредуется большинство функций NS5. Ингибирование опосредованного CRM1 экспорта NS5 приводит к измененной кинетике продукции вирусов и снижает индукцию воспалительного хемокина интерлейкина-8 (IL-8), что представляет собой новый подход к лечению заболеваний, вызванных DENV и других важных с медицинской точки зрения флавивирусов, включая в себя вирус гепатита С (Rawlinson, 2009).

Другие кодируемые вирусом РНК-связывающие белки, которые используют CRM1 для выхода из ядра, включают в себя белок оболочки HSV типа 1 (VP13/14, или hUL47), белок pp65 CMV человека, белок ORF 3b коронавируса SARS и белок матрикса (M) RSV (Williams, 2008, Sanchez, 2007, Freundt, 2009, Ghildyal, 2009).

Интересно, что многие из указанных вирусов ассоциированы с конкретными типами злокачественных опухолей человека, включая в себя гепатоклеточную карциному (HCC) вследствие хронической инфекции HBV или HCV, рак шейки матки вследствие HBV и карцинома из клеток Меркеля, связанная с MCV. Ингибиторы CRM1 могут, следовательно, характеризоваться благоприятными эффектами как на вирусный инфекционный процесс, а также на процесс опухолевой трансформации вследствие действия указанных вирусов.

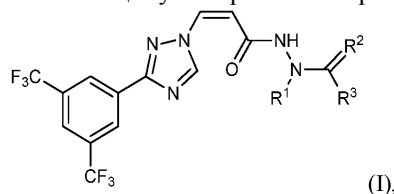
CRM1 контролирует ядерную локализацию и, следовательно, активность многочисленных принимающих участие в метаболизме ДНК ферментов, включая в себя гистондеацетилазы (HDAC), гистонацетилазотрансферазы (HAT) и гистонметилтрансферазы (HMT). Была продемонстрирована супрессия гипертрофии кардиомиоцитов с помощью необратимых ингибиторов CRM1 и, как полагают, она связана с удержанием в ядре (и активацией) HDAC 5, фермента, который, как известно, подавляет гипертрофическую генетическую программу (Monovich et al., 2009). Таким образом, ингибирование CRM1 может характеризоваться благоприятными эффектами при гипертрофических синдромах, включая в себя определенные формы застойной сердечной недостаточности и гипертрофические кардиомиопатии.

CRM1 также был связан с другими нарушениями. Нарушение Лебера, наследственное нарушение, характеризующееся дегенерацией ретинальных ганглиональных клеток и потерей зрения, связано с отсутствием активности переключения CRM1 (Gupta N, 2008). Также существует доказательство, связывающее нейродегенеративные нарушения с аномалиями в ядерном транспорте.

Ввиду вышеизложенного, существует потребность в открытии соединений, которые модулируют ядерный транспорт.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к соединениям и их фармацевтически приемлемым солям, применимым в качестве модуляторов ядерного транспорта, фармацевтически приемлемым композициям, содержащим соединения согласно настоящему изобретению, и способам применения указанных композиций в лечении различных нарушений. Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что модуляторы ядерного транспорта согласно настоящему изобретению и их фармацевтически приемлемые соли и/или композиции, обеспечивают требуемое воздействие *in vivo*, которое измеряется с помощью AUC у мыши, при этом проявляя пониженные уровни проникновения в головной мозг по сравнению с другими модуляторами. Соединения согласно настоящему изобретению характеризуются общей формулой I



(I),

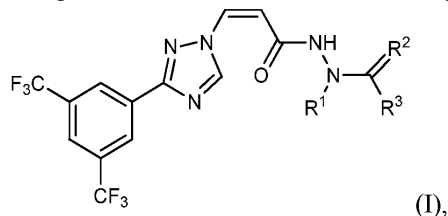
или представляют собой его фармацевтически приемлемую соль, причем каждая переменная является такой, как определено и описано в настоящем документе.

Соединения согласно настоящему изобретению и их фармацевтически приемлемые композиции

применимы для лечения разнообразных заболеваний, нарушений или состояний, связанных с аномальными клеточными ответами, запускаемыми ненадлежащим ядерным транспортом. Такие заболевания, нарушения или состояния включают в себя описанные в настоящем документе.

Предусмотренные настоящим изобретением соединения также применимы для исследования модуляции ядерного транспорта в биологических и патологических явлениях; исследования внутриклеточных путей передачи сигналов, опосредованных такими киназами; и сравнительной оценки новых модуляторов ядерного транспорта.

Более конкретно, настоящее изобретение относится к соединению формулы I:



или его фармацевтически приемлемой соли, сольвату или гидрату, где

R^1 выбран из водорода и C_1 - C_4 алкила;

R^2 выбран из O и S; и

R^3 выбран из $-N(R^4)-(C_3-C_6$ циклоалкила), $-C_1-C_6$ алкила, $-(C_0-C_4$ алкилен)гетероциклила, $-(C_0-C_4$ алкилен)гетероарила и замещенного R^3 ; причем

в указанном замещенном R^3 любая гетероарильная часть R^3 независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из $-OH$, $-SH$, нитро, галогена, amino, циано, C_1 - C_{12} алкила, C_2 - C_{12} алкенила, C_2 - C_{12} алкинила, C_1 - C_{12} алкокси, C_1 - C_{12} галоалкила, C_1 - C_{12} галоалкокси и C_1 - C_{12} алкилсульфанила; и

в указанном замещенном R^3 любая алкильная, алкиленовая или гетероциклильная часть R^3 независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из оксо, $-OH$, $-SH$, нитро, галогена, amino, циано, C_1 - C_{12} алкила, C_2 - C_{12} алкенила, C_2 - C_{12} алкинила, C_1 - C_{12} алкокси, C_1 - C_{12} галоалкила, C_1 - C_{12} галоалкокси и C_1 - C_{12} алкилсульфанила; и

R^4 выбран из водорода и C_1 - C_4 алкила, причем

гетероарил представляет собой 5-6-членное арильное кольцо, содержащее от одного до трех гетероатомов, независимо выбранных из O, S или N, и

гетероциклил представляет собой моноциклическое, слитое бициклическое, соединенное мостиком бициклическое, спиробициклическое или полициклическое 4-13-членное насыщенное или ненасыщенное алифатическое кольцо, содержащее 1, 2, 3, 4 или 5 гетероатомов, независимо выбранных из N, O или S.

Еще более конкретно R^2 представляет собой O; и

R^3 выбран из $-C_1-C_6$ алкила, $-(C_0-C_4$ алкилен)гетероциклила, $-(C_0-C_4$ алкилен)гетероарила и замещенного R^3 ; причем

в указанном замещенном R^3 любая алкильная, алкиленовая или гетероциклильная часть R^3 независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из оксо, $-OH$, $-SH$, нитро, галогена, amino, циано, C_1 - C_{12} алкила, C_2 - C_{12} алкенила, C_2 - C_{12} алкинила, C_1 - C_{12} алкокси, C_1 - C_{12} галоалкила, C_1 - C_{12} галоалкокси и C_1 - C_{12} алкилсульфанила;

в указанном замещенном R^3 любая гетероарильная часть R^3 независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из $-OH$, $-SH$, нитро, галогена, amino, циано, C_1 - C_{12} алкила, C_2 - C_{12} алкенила, C_2 - C_{12} алкинила, C_1 - C_{12} алкокси, C_1 - C_{12} галоалкила, C_1 - C_{12} галоалкокси и C_1 - C_{12} алкилсульфанила;

гетероарил представляет собой 5-6-членное арильное кольцо, содержащее от одного до трех гетероатомов, независимо выбранных из O, S или N, и

гетероциклил представляет собой моноциклическое, слитое бициклическое, соединенное мостиком бициклическое, спиробициклическое или полициклическое 4-13-членное насыщенное или ненасыщенное алифатическое кольцо, содержащее 1, 2, 3, 4 или 5 гетероатомов, независимо выбранных из N, O или S.

Еще более конкретно R^2 представляет собой O; и

R^3 представляет собой $-C_1-C_6$ алкил или указанный замещенный R^3 , причем в указанном замещенном R^3 R^3 независимо замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из $-OH$, $-SH$, нитро, галогена, amino, циано, C_1 - C_{12} алкила, C_2 - C_{12} алкенильной или C_2 - C_{12} алкинильной группы, C_1 - C_{12} алкокси, C_1 - C_{12} галоалкила, C_1 - C_{12} галоалкокси и C_1 - C_{12} алкилсульфанила.

R^1 может быть выбран из водорода и метила. R^2 может представлять собой O. R^4 может представлять собой водород.

R^3 может быть выбран из $-N(R^4)-(C_3-C_6$ циклоалкила), $-C_3-C_6$ алкила, $-(C_0-C_1$ алкилен)гетероциклила, $-(C_0-C_1$ алкилен)гетероарила и замещенного R^3 , причем

в указанном замещенном R^3 любая алкильная или алкиленовая часть R^3 независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из оксо и $-N(R^5)_2$, где каждый R^5 неза-

висимо выбран из водорода и C_1 - C_4 алкила;

любая гетероциклическая часть R^3 содержит по меньшей мере один атом азота в кольце, и указанный замещенный R^3 замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из C_1 - C_4 алкила и оксо; и

любая гетероарильная часть R^3 содержит по меньшей мере один атом азота в кольце, и указанный замещенный R^3 замещен одним или более C_1 - C_4 алкилами.

R^3 может быть выбран из $-C_1$ - C_6 алкила, $-(C_0$ - C_4 алкилен)гетероцикла, $-(C_0$ - C_4 алкилен)гетероарила и замещенного R^3 ; причем

в указанном замещенном R^3 алкильная или алкиленовая часть R^3 независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из оксо и $-N(R^5)_2$, где каждый R^5 независимо выбран из водорода и C_1 - C_4 алкила;

любая гетероциклическая часть R^3 содержит по меньшей мере один атом азота в кольце, и указанный замещенный R^3 замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из C_1 - C_4 алкила и оксо; и

любая гетероарильная часть R^3 содержит по меньшей мере один атом азота в кольце, и указанный замещенный R^3 замещен одним или более C_1 - C_4 алкилами.

Например, R^3 может представлять собой $-C_3$ - C_6 алкил.

Например, R^3 может представлять собой $-(C_0$ - C_1 алкилен)гетероцикл.

Например, R^3 может представлять собой $-(C_1$ алкилен)гетероцикл, где гетероцикл выбран из пиранина, пиперидина, морфолина и пиразола. Например, гетероцикл может представлять собой морфолин.

В одном конкретном варианте осуществления настоящего изобретения любая алкильная, алкиленовая, гетероциклическая и гетероарильная часть указанного замещенного R^3 независимо замещена аминной группой, характеризующейся формулой $-N(R^5)_2$, где каждый R^5 независимо выбран из водорода и C_1 - C_4 алкила.

Например, R^3 независимо замещен аминной группой, характеризующейся формулой $-N(R^5)_2$, где каждый R^5 независимо выбран из водорода и C_1 - C_4 алкила.

R^3 может быть выбран из $-N(R^4)$ - $(C_3$ - C_6 циклоалкила), $-C_3$ - C_6 алкила, $-(C_0$ - C_1 алкилен)гетероцикла, $-(C_0$ - C_1 алкилен)гетероарила и замещенного R^3 , причем

в указанном замещенном R^3 любая алкильная или алкиленовая часть R^3 замещена $-N(R^5)_2$, где каждый R^5 независимо выбран из водорода и C_1 - C_4 алкила;

в указанном замещенном R^3 любая гетероциклическая и гетероарильная часть R^3 содержит по меньшей мере один атом азота в кольце; и

в указанном замещенном R^3 любая гетероциклическая и гетероарильная часть R^3 замещена C_1 - C_4 алкилом.

R^3 может быть выбран из $-N(R^4)$ - $(C_3$ - C_6 циклоалкила), $-C_3$ - C_6 алкила, $-(C_0$ - C_1 алкилен)гетероцикла, $-(C_0$ - C_1 алкилен)гетероарила и замещенного R^3 , причем

в указанном замещенном R^3 любая алкильная или алкиленовая часть R^3 замещена $-N(R^5)_2$, где каждый R^5 независимо выбран из водорода и C_1 - C_4 алкила;

в указанном замещенном R^3 любая гетероциклическая и гетероарильная часть R^3 содержит по меньшей мере один атом азота в кольце; и

в указанном замещенном R^3 любая гетероциклическая и гетероарильная часть R^3 замещена C_1 - C_4 алкилом.

R^3 может быть выбран из $-C(CH_3)_3$, $-CH(NH_2)-CH(CH_3)_2$, $-NH$ -циклопропила, $-(CH_2)_{0-1}$ -пиранина, пиперидина, гидроксипиперидина, N -метилпиперидина, $-CH_2$ -морфолин-4-ила и метилпиразола.

R^3 может быть выбран из $-C(CH_3)_3$, $-CH(NH_2)-CH(CH_3)_2$, $-NH$ -циклопропила, $-(CH_2)_{0-1}$ -пирозин-2-ила, пиперидин-3-ила, $-CH_2$ -морфолин-4-ила и 5-метил-1- H -пиразол-4-ила. Например, R^3 выбран из $-C(CH_3)_3$, $-NH$ -циклопропила, $-CH_2$ -пирозин-2-ила, $-пирозин-2-ила$, $-CH_2$ -морфолин-4-ила и 5-метил-1- H -пиразол-4-ила. В одном из предпочтительных вариантов R^3 представляет собой $-C(CH_3)_3$.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения соединение представлено любой из структурных формул, изложенных ниже

№ соединения	Структура соединения	№ соединения	Структура соединения
1		9	
2		10	
3		11	
4		12	
5		13	
6		14	
7		15	
8			

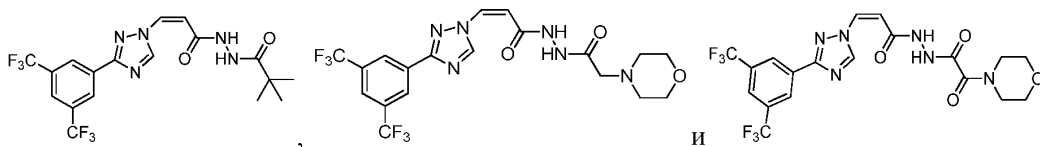
или представляет собой его фармацевтически приемлемую соль, сольват или гидрат.

В еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения соединение выбрано из любого одного из соединений 1, 2, 3, 4, 8, 11, 12 и 13, представленных следующими структурными формулами:

№ соединения	Структура соединения	№ соединения	Структура соединения
1		11	
2		12	
3		13	
4		8	

или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата или гидрата.

В еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения соединение представлено одной из следующих структурных формул:



или его фармацевтически приемлемой солью, сольватом или гидратом.

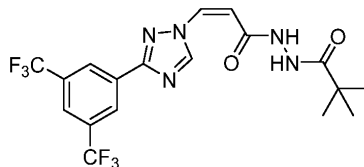
В другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию для лечения связанного с активностью CRM1 нарушения, содержащую соединение согласно изобретению или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или гидрат и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения связанного с активностью CRM1 нарушения, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению, где нарушение выбрано из пролиферативного нарушения, ангиогенеза, воспалительного нарушения, аутоиммунного нарушения, вирусной инфекции, раны, офтальмологического нарушения, нейродегенеративного нарушения, нарушения аномального роста ткани, связанного с приемом пищи нарушения, аллергий, респираторного нарушения, острого нарушения мозгового кровообращения и травматического повреждения головного мозга. Например, нарушение может представлять собой рак, при этом рак может представлять собой гематологическую злокачественную опухоль, которая может быть выбрана из лейкоза, лимфомы или миеломы. Более конкретно, миелома может представлять собой множественную миелому, лейкоз может быть выбран из острого миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелогенного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза и волосатоклеточного лейкоза, а лимфома может представлять собой неходжкинскую лимфому или может быть выбрана из кожной Т-клеточной лимфомы, лимфомы Беркита, лимфомы из клеток мантийной зоны и диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы. Рак может представлять собой солидную опухоль, при этом солидная опухоль может быть выбрана из опухоли предстательной железы, молочной железы, легких, толстого кишечника, поджелудочной железы, почки, яичника, печени, яичка, глотки, костей и мозга.

Например, способ может обеспечивать лечение нарушения, которое выбрано из ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, синдрома раздраженного кишечника, болезни Крона, слизистого колита, язвенного колита, гастрита, экземы, атопического дерматита, контактного дерматита, крапивницы, склеродермии, пузырчатки, пемфигоида, аллергического дерматита, гематологической злокачественной опухоли, лейкоза, миеломы, неходжкинской лимфомы, кожной Т-клеточной лимфомы, лимфомы Беркита, лимфомы из клеток мантийной зоны, фиброза, включая расширяющуюся кардиомиопатию, гипертрофическую кардиомиопатию, рестриктивную кардиомиопатию, фиброз легких, фиброз печени, гломерулонефрит, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, солидной опухоли, опухоли мягких тканей, саркомы, аденокарциномы и карциномы.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения нарушения, выбранного из красной волчанки, рассеянного склероза и амиотрофического латерального склероза, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению. Согласно одному аспекту соединение вводят перорально, парентерально, с помощью спрея для ингаляции, местно, ректально, назально, буккально, вагинально или посредством имплантированной емкости.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения красной волчанки, рассеянного склероза и амиотрофического латерального склероза, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества соединения, представленного следующей структурной формулой:



или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата или гидрата.

Согласно одному аспекту осуществления указанного способа соединение вводят перорально.

В одном варианте способы согласно настоящему изобретению могут быть пригодны для лечения нарушения, представляющего собой артрит, например ревматоидный артрит, псориаз или ожирение.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ стимуляции заживления раны у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения согласно изобретению.

Более конкретно, рана представляет собой поверхностную рану, операционную рану, внутреннюю рану, хроническую рану, язву, ожог или результат воздействия ионизирующего излучения.

Более конкретно, рана может быть выбрана из группы, состоящей из ожоговой раны, резаной раны,

открытой раны, операционной или послеоперационной раны, диабетического поражения, термического ожога, химического ожога, лучевого ожога, намина, пролежня и состояния, связанного с диабетом или плохим кровообращением.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения нейродегенеративного заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества соединения согласно изобретению, где нейродегенеративное заболевание выбрано из болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера и болезни Хантингтона.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения вирусной инфекции, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества соединения согласно изобретению, где вирусная инфекция вызвана вирусным патогеном, выбранным из аденовируса, вируса Коксаки, вируса денге, вируса энцефалита, вируса Эпштейна-Барра, вируса гепатита А, вируса гепатита В, вируса гепатита С, вируса простого герпеса 1 типа, вируса простого герпеса 2 типа, цитомегаловируса, вируса герпеса человека 8 типа, вируса иммунодефицита человека, вируса гриппа, вируса кори, вируса паротита, папилломавируса человека, вируса парагриппа, вируса полиомиелита, вируса бешенства, респираторно-синцитиального вируса, вируса краснухи, вируса ветряной оспы, вируса лихорадки Западного Нила, вируса денге и вируса желтой лихорадки.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения воспалительного нарушения, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества соединения согласно изобретению, где воспалительное нарушение выбрано из воспалительного заболевания кишечника, синдрома раздраженного кишечника, болезни Крона, слизистого колита, язвенного колита, гастрита, экземы, атопического дерматита, контактного дерматита, крапивницы, склеродермии, пузырчатки, пемфигоида, аллергического дерматита.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает перорально приемлемая лекарственная форма, содержащая соединение или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или гидрат согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

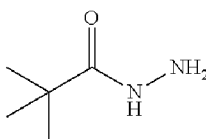
Указанная перорально приемлемая лекарственная форма может представлять собой капсулу, таблетку, леденец, пастилку, водную суспензию, микроинкапсулированную форму или водный раствор.

Указанная перорально приемлемая лекарственная форма может включать лекарственную форму для немедленного высвобождения, лекарственную форму для пролонгированного высвобождения или лекарственную форму для замедленного высвобождения.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает применение указанной перорально приемлемой лекарственной формы для лечения нарушения, выбранного из пролиферативного нарушения, ангиогенеза, воспалительного нарушения, аутоиммунного нарушения, вирусной инфекции, раны, офтальмологического нарушения, нейродегенеративного нарушения, нарушения аномального роста ткани, связанного с приемом пищи нарушения, аллергий, острого нарушения мозгового кровообращения, травматического повреждения головного мозга и респираторного нарушения.

Более конкретно, нарушение может быть выбрано из красной волчанки, рассеянного склероза и амиотрофического латерального склероза. Нарушение также может представлять собой рак.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ синтеза (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-пивалоилакрилогидразида, включающий приведение в реакцию (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акриловой кислоты и пивалогидразида, имеющего формулу



В указанном способе (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акриловая кислота может быть получена приведением в реакцию (Z)-изопропил 3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилата с LiOH. (Z)-изопропил 3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилат может быть получен приведением в реакцию 3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазола с (Z)-изопропил 3-йодакрилатом. 3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол может быть получен приведением в реакцию 3,5-бис(трифторметил)бензотиамида с гидратом гидразина. 3,5-бис(трифторметил)бензотиамида может быть получен приведением в реакцию 3,5-бис(трифторметил)бензонитрила с сульфгидратом натрия.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ синтеза (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акриловой кислоты, включающий приведение в реакцию (Z)-изопропил 3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилата с LiOH.

Краткое описание чертежей

Вышеизложенное станет очевидным из последующего более конкретного описания иллюстративных вариантов осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 1 представлен график зависимости среднего объема опухоли от времени и на нем показан средний объем в группе ксенотрансплантатных опухолей Z-138 на мышах, получивших лечение с помощью инертного носителя, 80 мг/кг циклофосфамида, 15 мг/кг соединения 2 или 7,5 мг/кг соединения 2 (планки погрешностей представляют SEM (стандартная ошибка среднего) для каждой группы).

На фиг. 2 представлен график зависимости среднего объема опухоли от времени и на нем показано групповое среднее значение объема в группе ксенотрансплантатных опухолей A549 на мышах, получивших лечение с помощью инертного носителя, 5 мг/кг цисплатина, 10 мг/кг соединения 2 или 5 мг/кг соединения 2 (планки погрешностей представляют SEM для каждой группы).

На фиг. 3А представлен график зависимости общего показателя артрита от времени и на нем показан клинический показатель артрита для самцов мышей линии BALB/c с индуцированным антиколлагеновым антителом артритом, получивших лечение с помощью инертного носителя, дексаметазона, 4 мг/кг соединения 2 или 7,5 мг/кг соединения 2 в течение 12-дневного периода наблюдений (¥ = получившая лечение дексаметазоном группа значительно отличается от получившей лечение инертным носителем группы; # = получившая лечение с помощью 7,5 мг/кг соединения 2 группа значительно отличается от получившей лечение инертным носителем группы; † = получившая лечение с помощью 4 мг/кг соединения 2 группа значительно отличается от получившей лечение инертным носителем группы).

На фиг. 3В представлен график зависимости среднего размера задней лапы от времени и на нем показано групповое среднее значение толщины задней лапы для самцов мышей линии BALB/c с индуцированным антиколлагеновым антителом артритом, получивших лечение с помощью инертного носителя, дексаметазона, 4 мг/кг соединения 2 или 7,5 мг/кг соединения 2 в течение 12-дневного периода наблюдений (¥ = получившая лечение с помощью дексаметазона группа значительно отличается от получившей лечение инертным носителем группы; # = получившая лечение с помощью 7,5 мг/кг соединения 2 группа значительно отличается от получившей лечение инертным носителем группы; † = получившая лечение с помощью 4 мг/кг соединения 2 группа значительно отличается от получившей лечение инертным носителем группы).

На фиг. 4А представлен график зависимости отека сустава от времени и показан отек сустава, измеренный по шкале 0-4 у нативных крыс и крыс, получивших лечение согласно модели CIA, с помощью положительного контроля или с помощью соединения 2.

На фиг. 4В представлен график зависимости клинических показателей от времени и на нем показаны клинические показатели артрита нативных крыс и крыс, получивших лечение согласно модели CIA, с помощью положительного контроля или с помощью соединения 2.

На фиг. 5 представлены репрезентативные изображения от каждой группы лечения в модели CIA и на них показана гистопатология задних лап нативных крыс и крыс, получивших лечение согласно модели, с помощью положительного контроля или соединения 2.

На фиг. 6А представлен график зависимости толщины уха от времени и на нем показано групповое среднее значение толщины левого уха самок мышей линии BALB/c, получивших лечение с помощью инертного носителя, РМА и инертного носителя, РМА и соединения 2 или РМА и бетаметазона.

На фиг. 6В представлен график зависимости толщины уха от времени и на нем показано групповое среднее значение толщины правого уха самок мышей линии BALB/c, получивших лечение с помощью инертного носителя, РМА и инертного носителя, РМА и соединения 2 или РМА и бетаметазона.

На фиг. 6С представлен график зависимости активности болезни от времени и на нем показано групповое среднее значение активности болезни левого уха самок мышей линии BALB/c, получивших лечение с помощью инертного носителя, РМА и инертного носителя, РМА и соединения 2 или РМА и бетаметазона.

На фиг. 6D представлен график зависимости активности болезни от времени и на нем показано групповое среднее значение активности болезни правого уха самок мышей линии BALB/c, получивших лечение с помощью инертного носителя, РМА и инертного носителя, РМА и соединения 2 или РМА и бетаметазона.

На фиг. 7А представлен график зависимости индекса активности болезни от времени и на нем показана активность болезни самцов мышей линии BALB/c, получивших лечение с помощью инертного носителя, IMQ и инертного носителя, IMQ и 1 мкМ соединения 2 или IMQ и 10 мг/кг циклофосфамида перед введением IMQ.

На фиг. 7В представлен график зависимости индекса активности болезни от времени и на нем показана активность болезни самцов мышей линии BALB/c, получивших лечение с помощью инертного носителя, IMQ и инертного носителя, IMQ и 1 мкМ соединения 2 или IMQ и 10 мг/кг циклофосфамида перед введением IMQ.

На фиг. 8А представлен график зависимости кумулятивного потребления пищи от времени и на нем показано кумулятивное потребление пищи не страдающими ожирением крысами линии Zucker и страдающими ожирением крысами линии Zucker, получившими лечение инертным носителем (VEH), 1,5 мг/кг соединения или 3,0 мг/кг соединения 2.

На фиг. 8В представлен график зависимости среднего потребления пищи от времени и на нем пока-

зано среднее потребление пищи не страдающими ожирением крысами линии Zucker и страдающими ожирением крысами линии Zucker, получившими лечение инертным носителем (VEH), 1,5 мг/кг соединения или 3,0 мг/кг соединения 2.

На фиг. 9 представлена гистограмма зависимости изменения массы тела в процентах от времени и на ней показано изменение массы тела в процентах у не страдающих ожирением крыс линии Zucker и страдающих ожирением крыс линии Zucker, получивших лечение с помощью инертного носителя (VEH), 1,5 мг/кг соединения или 3,0 мг/кг соединения 2 в течение периода лечения (дни исследования 10 и 17) и в течение периода отмывки (день исследования 24) в эксперименте.

На фиг. 10A представлен график зависимости кумулятивного потребления пищи от времени и на нем показано кумулятивное потребление пищи крысами, которых кормили нормальным кормом, и крысами, которых кормили рационом с высоким содержанием жиров и лечили с помощью инертного носителя, 1,5 мг/кг соединения или 3,0 мг/кг соединения 2 в течение исходной фазы, фазы лечения и фазы отмывки в исследовании.

На фиг. 10B представлен график зависимости средней массы тела от времени и на нем показана средняя масса тела крыс, которых кормили нормальным кормом, и крыс, которых кормили рационом с высоким содержанием жиров и лечили с помощью инертного носителя, 1,5 мг/кг соединения или 3,0 мг/кг соединения 2 в течение исходной фазы, фазы лечения и фазы отмывки в исследовании.

На фиг. 11 представлена гистограмма зависимости изменения массы тела в процентах от времени и на ней показано изменение массы тела в процентах крыс, которых кормили нормальным кормом, и крыс, которых кормили рационом с высоким содержанием жиров и лечили с помощью инертного носителя, 1,5 мг/кг соединения или 3,0 мг/кг соединения 2.

На фиг. 12A представлен график экспрессии Nrf2 при разнообразных условиях, включая в себя условия нокдауна.

На фиг. 12B представлен график экспрессии NQO1 при разнообразных условиях, включая в себя условия нокдауна.

На фиг. 12C представлен график экспрессии EPHX1 при разнообразных условиях, включая в себя условия нокдауна.

На фиг. 13A представлена гистограмма кратности изменения экспрессии мРНК COX-2 и на ней показано, что соединение 1 не оказывает воздействия на транскрипцию COX-2. Анализ экспрессии COX-2 мРНК с помощью qRT-ПЦР необработанных клеток HeLa (контроль) сравнивали с клетками HeLa, обработанными 10 мкМ соединения 1, 20 нг/мл TNF α или 10 мкМ соединения 1+20 нг/мл TNF α .

На фиг. 13B представлен график интенсивности экспрессии белка COX-2 и на нем показано, что соединение 1 ингибирует индуцированную TNF α экспрессию белка COX-2.

На фиг. 14A представлено изображение клеток, обработанных ДМСО, 20 нг/мл TNF α или соединением 1+20 нг/мл TNF α , и на нем показана локализация разнообразных связанных с воспалением транспортируемых CRM1 белков.

На фиг. 14B представлено изображение клеток, обработанных ДМСО, 20 нг/мл TNF α или соединением 1+20 нг/мл TNF α , и на нем показана локализация IkB, NF κ B, NRF2, PPAR γ и RXR α .

На фиг. 15A представлен график зависимости латентного периода для достижения платформы в исследовании MWM от времени и на нем показан эффект ложной операции, лечения контролем, лечения прогестероном и различными дозами соединения 1 на латентный период у мышей для достижения платформы в течение фазы достижения в исследовании MWM (данные представляют среднее $\pm$ SEM).

На фиг. 15B представлен график концентрации цитокина и на нем показана концентрация некоторых цитокинов в плазме крыс.

На фиг. 15C представлены фотографии цельного головного мозга животных, получающих ложные поражения (симуляция), CCI + инертный носитель (контроль) или CCI + соединение 1 (6 мг/кг), на которых показаны результаты качественного визуального осмотра цельного головного мозга перед получением срезов вибратором. Осмотр показал, что ни одно (0 из 4) из получивших симуляцию животных не показало повреждения дорсально-медиальной кортикальной ткани. Сильно оттаясь от этого, все четыре контроля CCI проявили тяжелое билатеральное повреждение, ограниченное указанной областью коры. Животные с CCI, которые получили соединение 1, показали повреждение в диапазоне от умеренного до минимального. Следует отметить, что головной мозг, демонстрирующий наиболее тяжелое повреждение в группе соединения 1, был менее поражен, чем все образцы головного мозга в группе CCI контроля.

На фиг. 15D представляет собой микрофотографию при малом увеличении мечения NeuN дорсальной кортикальной зоны и вентральной кортикальной зоны получивших симуляцию (симуляция), получивших повреждение с помощью CCI + инертный носитель (контроль) и получивших повреждение с помощью CCI + соединение 1 (KPT) животных.

На фиг. 15E представлены микрофотографии иммунофлуоресцентного мечения IgG и TNF α крысы у животных, получивших симуляцию (симуляция), получивших повреждение с помощью CCI + инертный носитель (контроль) и получивших повреждение с помощью CCI + соединение 1 (KPT).

На фиг. 16A представлен график зависимости клинического показателя от времени и на нем пока-

заны клинические показатели артрита у нативных самок крыс линии Lewis, контрольных самок крыс линии Lewis с артритом или самок крыс линии Lewis с артритом, получивших лечение с помощью соединения 2.

На фиг. 16B представлен график зависимости отека сустава от времени и на нем показан отек сустава, измеренный по шкале 0-4 у нативных самок крыс линии Lewis, контрольных самок крыс линии Lewis с артритом или самок крыс линии Lewis с артритом, получивших лечение с помощью соединения 2.

На фиг. 17A представлен график минеральной плотности костной ткани (BMD) костей предплюсны нативных самок крыс линии Lewis, контрольных самок крыс линии Lewis с артритом или самок крыс линии Lewis с артритом, получивших лечение с помощью соединения 2.

На фиг. 17B представлена визуализация изображения трехмерной микро-КТ задних лап нативных самок крыс линии Lewis, контрольных самок крыс линии Lewis с артритом или самок крыс линии Lewis с артритом, получивших лечение с помощью соединения 2.

На фиг. 17C представлен график зависимости концентрации IL-1 β в синовиальной жидкости от времени и на нем показана концентрация IL-1 β в синовиальной жидкости, собранной от крыс в группе А (нативные), группе В (модель) и группе С (соединение 2 в концентрации 5 мг/кг QoD) в дни 21 и 27 исследования CIA № 2.

На фиг. 17D представлен график зависимости концентрации IL-6 в синовиальной жидкости от времени и на нем показана концентрация IL-6 в синовиальной жидкости, собранной от крыс в группе А (нативные), группе В (модель) и группе С (соединение 2 в концентрации 5 мг/кг QoD) в дни 21 и 27 исследования CIA № 2.

На фиг. 17E представлен график зависимости концентрации MCP-1 в синовиальной жидкости от времени и на нем показана концентрация MCP-1 в синовиальной жидкости, собранной от крыс в группе А (нативные), группе В (модель) и группе С (соединение 2 в концентрации 5 мг/кг QoD) в дни 21 и 27 исследования CIA № 2.

На фиг. 17F представлен график зависимости концентрации CRP в синовиальной жидкости от времени и на нем показана концентрация CRP в синовиальной жидкости, собранной от крыс в группе А (нативные), группе В (модель) и группа С (соединение 2 в концентрации 5 мг/кг QoD) в дни 21 и 27 исследования CIA № 2.

На фиг. 17G представлен график зависимости концентрации IL-1 β в сыворотке от времени и на нем показана концентрация IL-1 β в образцах сыворотки крыс, собранных от крыс в группе А (нативные), группе В (модель) и группе С (соединение 2 в концентрации 5 мг/кг QoD) в дни 15, 21 и 27 исследования CIA № 2.

На фиг. 18A представлена схема мышинной модели MOG-индуцированного ЕАЕ у самок мышей, описанной в настоящем документе.

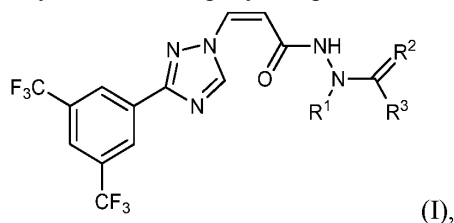
На фиг. 18B представлен график зависимости клинического показателя от дня исследования и на нем показаны эффекты лечения инертным носителем, лечения дексаметазоном и лечения соединением 1 на клинический показатель самок мышей в мышинной модели MOG-индуцированного ЕАЕ, описанной в настоящем документе.

На фиг. 19 представлены фотографии ран, которые лечили местно или системно с помощью соединения 1 или его соответствующим инертным носителем, и на них показаны результаты оценки морфологии ран, проведенной на 5 день после нанесения раны.

Подробное описание изобретения

Соединения согласно настоящему изобретению.

Согласно первому варианту осуществления предусмотрено соединение формулы I:



или его фармацевтически приемлемая соль, причем

R¹ выбран из водорода и C₁-C₄ алкила;

R² выбран из О и S; и

R³ выбран из -N(R⁴)-(C₃-C₆ циклоалкила), -C₁-C₆ алкила, -(C₀-C₄ алкилен)гетероциклила и -(C₀-C₄ алкилен)гетероарила, причем любая алкильная, алкиленовая, гетероциклильная или гетероарилная часть R³ необязательно и независимо замещена; и

R⁴ выбран из водорода и C₁-C₄ алкила.

Согласно первому аспекту первого варианта осуществления R¹ выбран из водорода и метила. Значения оставшихся переменных являются такими, как описано в первом варианте осуществления.

Согласно второму аспекту первого варианта осуществления R^1 представляет собой водород. Значения оставшихся переменных являются такими, как описано в первом варианте осуществления.

Согласно третьему аспекту первого варианта осуществления R^2 представляет собой О. Значения оставшихся переменных являются такими, как описано в первом варианте осуществления или его первом или втором аспекте.

Согласно четвертому аспекту первого варианта осуществления R^2 представляет собой S. Значения оставшихся переменных являются такими, как описано в первом варианте осуществления или его первом-третьем аспектах.

Согласно пятому аспекту первого варианта осуществления R^4 представляет собой водород.

Согласно шестому аспекту первого варианта осуществления R^3 выбран из $-N(R^4)-(C_3-C_6$ циклоалкила), $-C_3-C_6$ алкила, $-(C_0-C_1$ алкилен)гетероциклила и $-(C_0-C_1$ алкилен)гетероарила, причем любая алкильная или алкиленовая часть R^3 необязательно замещена $-N(R^5)_2$, где каждый R^5 независимо выбран из водорода и C_1-C_4 алкила; любая гетероциклическая и гетероарильная часть R^3 содержит по меньшей мере один атом азота в кольце; и любая гетероциклическая и гетероарильная часть R^3 необязательно замещена C_1-C_4 алкилом. Значения оставшихся переменных являются такими, как описано в первом варианте осуществления или его первом-пятом аспектах.

Согласно седьмому аспекту первого варианта осуществления R^3 выбран из $-C(CH_3)_3$, $-CH(NH_2)-CH(CH_3)_2$, $-NH$ -циклопропила, $-(CH_2)_{0-1}$ -пиазинила, пиперидинила, гидроксипиперидинила, N-метилпиперидинила, $-CH_2$ -морфолин-4-ила и метилпиазолила. Значения оставшихся переменных являются такими, как описано в первом варианте осуществления или его первом-пятом аспектах.

Согласно восьмому аспекту первого варианта осуществления R^3 выбран из $-C(CH_3)_3$, $-CH(NH_2)-CH(CH_3)_2$, $-NH$ -циклопропила, $-(CH_2)_{0-1}$ -пиазин-2-ила, пиперидин-3-ила, $-CH_2$ -морфолин-4-ила и 5-метил-1-N-пиазол-4-ила. Значения оставшихся переменных являются такими, как описано в первом варианте осуществления или его первом-пятом аспектах.

Согласно девятому аспекту первого варианта осуществления R^3 выбран из $-C(CH_3)_3$, $-NH$ -циклопропила, $-CH_2$ -пиазин-2-ила, -пиазин-2-ила, $-CH_2$ -морфолин-4-ила и 5-метил-1-N-пиазол-4-ила. Значения оставшихся переменных являются такими, как описано в первом варианте осуществления или его первом-пятом аспектах.

Второй вариант осуществления представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, причем R^3 выбран из $-N(R^4)-(C_3-C_6$ циклоалкила), $-C_3-C_6$ алкила, $-(C_0-C_1$ алкилен)гетероциклила и $-(C_0-C_1$ алкилен)гетероарила, причем

любая алкильная или алкиленовая часть R^3 необязательно замещена $-N(R^5)_2$, где каждый R^5 независимо выбран из водорода и C_1-C_4 алкила;

любая гетероциклическая и гетероарильная часть R^3 содержит по меньшей мере один атом азота в кольце; и

любая гетероциклическая и гетероарильная часть R^3 необязательно замещена C_1-C_4 алкилом.

Согласно первому аспекту второго варианта осуществления R^3 выбран из $-C(CH_3)_3$, $-CH(NH_2)-CH(CH_3)_2$, $-NH$ -циклопропила, $-(CH_2)_{0-1}$ -пиазинила, пиперидинила, гидроксипиперидинила, N-метилпиперидинила, $-CH_2$ -морфолин-4-ила и метилпиазолила.

Согласно второму аспекту второго варианта осуществления R^3 выбран из $-C(CH_3)_3$, $-CH(NH_2)-CH(CH_3)_2$, $-NH$ -циклопропила, $-(CH_2)_{0-1}$ -пиазин-2-ила, пиперидин-3-ила, $-CH_2$ -морфолин-4-ила и 5-метил-1-N-пиазол-4-ила.

Согласно третьему аспекту второго варианта осуществления R^3 выбран из $-C(CH_3)_3$, $-NH$ -циклопропила, $-CH_2$ -пиазин-2-ила, -пиазин-2-ила, $-CH_2$ -морфолин-4-ила и 5-метил-1-N-пиазол-4-ила.

Согласно третьему варианту осуществления предусмотрено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль, причем R^3 выбран из $-N(R^4)-(C_3-C_6$ циклоалкила), $-C_3-C_6$ алкила, $-(C_0-C_1$ алкилен)гетероциклила и $-(C_0-C_1$ алкилен)гетероарила, причем

любая алкильная или алкиленовая часть любого R^3 необязательно и независимо замещена одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из оксо и $-N(R^5)_2$, где каждый R^5 независимо выбран из водорода и C_1-C_4 алкила;

любая гетероциклическая часть R^3 содержит по меньшей мере один атом азота в кольце и необязательно замещена одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из C_1-C_4 алкил и оксо; и

любая гетероарильная часть R^3 содержит по меньшей мере один атом азота в кольце и необязательно замещена одним или несколькими C_1-C_4 алкилами. Значения оставшихся переменных являются такими, как описано в первом варианте осуществления или его первом-пятом аспектах.

Согласно первому аспекту третьего варианта осуществления R^3 представляет собой $-(C_0-C_1$ алкилен)гетероциклил. Значения оставшихся переменных являются такими, как описано в первом варианте осуществления или его первом-пятом аспектах.

Согласно второму аспекту третьего варианта осуществления R^3 представляет собой $-(C_0-C_1$ алкилен)гетероциклил, причем гетероциклил выбран из пиазинила, пиперидинила, морфолинла и пиазолила. Значения оставшихся переменных являются такими, как описано в первом варианте осуществления

или его первом-пятом аспектах.

Согласно третьему аспекту третьего варианта осуществления R^3 представляет собой $-(C_0-C_1 \text{ алкилен})$ гетероциклил, причем гетероциклил представляет собой морфолинил. Значения оставшихся переменных являются такими, как описано в первом варианте осуществления или его первом-пятом аспектах.

Согласно четвертому аспекту третьего варианта осуществления R^3 представляет собой $-(C_1 \text{ алкилен})$ гетероциклил. Значения оставшихся переменных являются такими, как описано в первом варианте осуществления или его первом-пятом аспектах.

Согласно пятому аспекту третьего варианта осуществления R^3 представляет собой $-(C_1 \text{ алкилен})$ морфолинил. Значения оставшихся переменных являются такими, как описано в первом варианте осуществления или его первом-пятом аспектах.

Иллюстративные соединения формулы I представлены в табл. 1.

Таблица 1

№ соединения	Структура соединения	Физические данные (^1H ЯМР и ЖХ-МС ($M+H$) $^+$)
1		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$, м.д.) δ = 10,35 (s, 1H), 9,66 (s, 1H), 9,64 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,28 (s, 1H), 7,48-7,50 (d, $J=8$ Гц, 1H), 6,00-6,03 (d, $J=12$ Гц, 1H), 1,15 (s, 9H). Расчетное значение ЖХ-МС: 450,36, обнаруженное: 450,19 (время удерживания 2,89 мин, чистота: 94,5%).
2		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$, м.д.) δ = 10,56 (s, 1H), 9,94 (s, 1H), 9,61 (s, 1H), 8,55 (s, 2H), 8,28 (s, 2H), 7,48-7,51 (d, $J=10,8$ Гц, 1H), 6,01-6,03 (d, $J=10,4$ Гц, 1H), 3,60-3,62 (t, 4H), 3,08 (s, 2H). Расчетное значение ЖХ-МС: 493,38, обнаруженное: 493,24 (время удерживания 2,29 мин, чистота: 99,48%).
3		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$, м.д.) δ = 13,01 (bs, 1H), 10,47 (bs, 1H), 10,03 (s, 1H), 9,70 (s, 1H), 8,56 (s, 2H), 8,28 (s, 1H), 7,97 (bs, 1H), 7,51-7,54 (d, $J=10,8$ Гц, 1H), 6,06-6,08 (d, $J=10,4$ Гц, 1H), 2,41 (s, 3H). Расчетное значение ЖХ-МС: 474,34, обнаруженное: 474,14 (время удерживания 2,51 мин, чистота: 99,88%).
4		^1H ЯМР (400 МГц, MeOD , м.д.) δ = 9,67 (s, 1H), 8,66 (s, 2H), 8,09 (s, 1H), 7,44-7,47 (d, $J=10,8$ Гц, 1H), 6,02 (m, 1H), 4,64 (s, 1H), 3,33 (m, 1H), 2,88 (m, 1H), 0,91 (m, 2H), 0,79 (m, 2H). Расчетное значение ЖХ-МС for: $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{F}_6\text{N}_6\text{OS}$ [$M+H$] $^+$: 465,40, обнаруженное: 465,19 (время удерживания 2,78 мин, чистота: 99,63%).
5		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$, м.д.) δ = 10,36 (s, 1H), 9,10 (s, 1H), 8,53 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,32-7,34 (d, $J=10,0$ Гц, 1H), 6,05-6,07 (d, $J=10,0$ Гц, 1H), 3,56 (s, 4H), 3,10 (s, 3H), 3,05 (s, 2H), 2,51 (s, 4H). Расчетное значение ЖХ-МС for: $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{F}_6\text{N}_6\text{O}_3$ [$M+H$] $^+$: 507,41, обнаруженное: 507,24 (время удерживания 2,40 мин, чистота: 99,61%).
6		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$, м.д.) δ = 9,73 (s, 1H), 8,56 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,41-7,44 (d, $J=10,4$ Гц, 1H), 5,98-6,00 (d, $J=10,4$ Гц, 1H), 2,91 (d, 1H), 2,81 (d, 1H), 2,34-2,58 (m, 4H), 1,77 (m, 1H), 1,54 (m, 2H), 1,34 (m, 1H), 1,23 (s, 2H). Расчетное значение ЖХ-МС: 477,38, обнаруженное: 477,24 (время удерживания 2,38 мин, чистота: 95,46%).
7		^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$, м.д.) δ = 10,88 (s, 1H), 10,76 (s, 1H), 9,58 (s, 1H), 8,55 (s, 2H), 8,31 (s, 1H), 8,24 (s, 2H), 7,53-7,56 (d, $J=10,4$ Гц, 1H), 6,06-6,09 (d, $J=10,4$ Гц, 1H), 3,69 (s, 1H), 2,13 (m, 1H), 1,01 (d, 6H). Расчетное значение ЖХ-МС: 465,37, обнаруженное: 465,24 (время удерживания 2,45 мин, чистота: 95,19%).

8		¹ H ЯМР (400 МГц, ДМСО- <i>d</i> ₆ , м.д.) δ = 10,95 (s, 1H), 10,82 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 9,22 (s, 1H), 8,95 (s, 1H), 8,81 (s, 1H), 8,55 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,56-7,53 (d, <i>J</i> =10,4 Гц, 1H), 6,10-6,08 (d, <i>J</i> =10,4 Гц, 1H). Расчетное значение ЖХ-МС: 472,32; обнаруженное: 472,14 (время удерживания 2,68 мин, чистота: 93,5%)
9		¹ H ЯМР (400 МГц, ДМСО- <i>d</i> ₆ , м.д.) δ = 10,61 (s, 1H), 10,26 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,30 (s, 1H), 7,52-7,49 (d, <i>J</i> =10,4 Гц, 1H), 6,02-6,05 (d, <i>J</i> =10,4 Гц, 1H), 3,38 (m, 3H), 2,91 (m, 2H), 2,70 (s, 3H), 1,80 (m, 2H), 1,76 (m, 2H). Расчетное значение ЖХ-МС: 491,41; обнаруженное: 491,24 (время удерживания 2,28 мин, чистота: 99,97%)
10		¹ H ЯМР (400 МГц, ДМСО- <i>d</i> ₆ , м.д.) δ = 10,88 (s, 1H), 10,76 (s, 1H), 9,58 (s, 1H), 8,55 (s, 2H), 8,31 (s, 1H), 8,24 (s, 2H), 7,53-7,56 (d, <i>J</i> =10,4 Гц, 1H), 6,06-6,09 (d, <i>J</i> =10,4 Гц, 1H), 3,69 (s, 1H), 2,13 (m, 1H), 1,01 (d, 6H). Расчетное значение ЖХ-МС: 465,37; обнаруженное: 465,24 (время удерживания 2,45 мин, чистота: 95,19%)
11		¹ H ЯМР (400 МГц, ДМСО- <i>d</i> ₆ , м.д.) δ = 10,69 (s, 1H), 10,54 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,58 (m, 2H), 8,56 (s, 2H), 8,28 (s, 1H), 7,49-7,51 (d, <i>J</i> =10,8 Гц, 1H), 6,01-6,04 (d, <i>J</i> =10,4 Гц, 1H), 3,84 (s, 2H). Расчетное значение ЖХ-МС: 486,35; обнаруженное: 486,29 (время удерживания 2,49 мин, чистота: 99,96%)
12		¹ H ЯМР (400 МГц, ДМСО- <i>d</i> ₆) δ 10,70-10,88 (m, 2H), 9,56 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,52-7,55 (d, <i>J</i> = 10,4 Гц, 1H), 6,0-6,03 (d, <i>J</i> = 10,4 Гц, 1H), 3,51-3,64 (m, 8H). ЖХ-МС <i>m/z</i> (отношение массы к заряду) 507,25 [M+H] ⁺ , <i>t_R</i> = 2,012 мин
13		¹ H ЯМР (400 МГц, ДМСО- <i>d</i> ₆) δ 10,58 (s, 1H), 9,83 (s, 1H), 9,56 (s, 1H), 8,54-8,56 (m, 2H), 8,25-8,30 (m, 1H), 7,49-7,51 (d, <i>J</i> =10,4 Гц, 1H), 6,01-6,04 (d, <i>J</i> =10,4 Гц, 1H), 3,44-3,57 (m, 2H), 3,28-3,34 (m, 2H), 3,21 (s, 1H), 3,15 (s, 1H), 2,84-2,88 (m, 2H), 0,93-1,04 (m, 6H): ЖХ-МС <i>m/z</i> 521,18 [M+H] ⁺ , <i>t_R</i> 1,898 мин
14		¹ H ЯМР (400 МГц, ДМСО- <i>d</i> ₆) δ 10,33 (bs, 2H), 9,63 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,30 (s, 1H), 7,50-7,52 (d, <i>J</i> = 8 Гц, 1H), 6,01-6,03 (d, <i>J</i> = 8 Гц, 1H), 4,08-4,12 (m, 4H), 3,85-3,87 (m, 2H), 3,41-3,44 (m, 2H). ЖХ-МС <i>m/z</i> 507,13 [M+H] ⁺ , <i>t_R</i> 1,950 мин
15		¹ H ЯМР (400 МГц, ДМСО- <i>d</i> ₆) δ 10,55 (s, 1H), 9,81 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 8,56 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,49-7,51 (d, <i>J</i> = 10,4 Гц, 1H), 6,01-6,03 (d, <i>J</i> = 10,4 Гц, 1H), 3,65-3,67 (m, 2H), 3,30-3,34 (m, 2H), 3,08 (bs, 2H), 2,55-2,58 (m, 2H), 0,96 (s, 6H). ЖХ-МС <i>m/z</i> 521,18 [M+H] ⁺ , <i>t_R</i> 1,937 мин

Согласно некоторым вариантам осуществления соединение согласно настоящему изобретению выбрано из любого одного из соединений 1-11. Согласно одному аспекту указанных вариантов осуществления соединение выбрано из любого одного из соединений 1, 2, 3, 4, 8 и 11.

Фармакокинетические параметры (РК) играют возрастающую роль в открытии и разработке лекарственных средств. Фармакокинетические параметры представляют собой количественное изучение динамики абсорбции, распределения, метаболизма и/или выделения лекарственного средства. Когда вводят лекарственное средство, оно быстро распределяется из места его введения в системный кровоток. Один показатель степени распределения терапевтического средства представляет собой площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени (AUC), рассчитанную до последней измеряемой концентрации (AUC_i) и экстраполированную до бесконечности (AUC_{inf}). AUC, таким образом, представляет собой часто используемый параметр для количественного определения воздействия лекарственного средства.

Как правило, чем выше воздействие терапевтического средства, тем выше эффекты средства. Тем не менее, высокое воздействие терапевтического средства может характеризоваться неблагоприятными эффектами на определенные ткани, такие как головной мозг. Наряду с тем, что гематоэнцефалический барьер (BBB), защитная сеть, состоящая из плотных контактов между эндотелиальными клетками, огра-

ничивает диффузию гидрофильных и/или больших молекул, лекарственные средства с высокой AUC все еще способны проникать через BBB и/или в спинно-мозговую жидкость. Такое проникновение зачастую является нежелательным и может приводить к нежелательным побочным эффектам. В настоящее время деятельность по разработке лекарственных средств частично направлена на достижение баланса между максимальным увеличением воздействия лекарственного средства (т.е. AUC) при минимизации проникновения в головной мозг.

Соотношение содержания в головном мозге к содержанию в плазме (В:Р) представляет собой один такой способ количественного определения относительного распределения терапевтического средства в ткани головного мозга к циркулирующему терапевтическому средству. Такое соотношение предоставляет один показатель проникновения в головной мозг данного терапевтического средства. Высокое соотношение содержания в головном мозге к содержанию в плазме является предпочтительным, когда целевые заболевания расположены в центральной нервной системе (CNS), включая в себя головной мозг и спинно-мозговую жидкость. Тем не менее, пониженное соотношение содержания в головном мозге к содержанию в плазме, как правило, предпочтительно для не направленных на ЦНС терапевтических средств для минимизации проникновения в головной мозг во избежание потенциальных побочных эффектов. Таким образом, низкое соотношение содержания в головном мозге к содержанию в плазме является предпочтительным во избежание нежелательного накопления терапевтических средств в ткани головного мозга и ЦНС.

Как подробно представлено в разделе примеров, соединения согласно настоящему изобретению проявляют повышенную AUC и/или пониженное соотношение В:Р по сравнению с другими ингибиторами ядерного транспорта, такими как ингибиторы, раскрытые в заявке на выдачу патента США № 13/041377 того же заявителя, поданной 5 марта 2011 г. и опубликованной как US 2009/0275607 10 ноября 2011 г. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение включает соединение формулы I, причем соединение характеризуется <1 мкМ (меньше чем 1 мкМ) активностью ядерного экспорта, AUC_{inf} составляющей больше чем приблизительно 3500; и В:Р, составляющим меньше чем приблизительно 2,5 при введении мыши дозы 10 мг/кг перорально.

Новые признаки согласно настоящему изобретению станут очевидными специалистам в настоящей области техники при изучении следующего подробного описания настоящего изобретения. Следует понимать, тем не менее, что подробное описание настоящего изобретения и представленные конкретные примеры, наряду с указанием определенных вариантов осуществления настоящего изобретения, рассмотрены исключительно для целей иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации в пределах сущности и объема настоящего изобретения станут очевидными специалистам в настоящей области техники из подробного описания настоящего изобретения и последующей формулы изобретения.

Соединения и определения.

Соединения согласно настоящему изобретению включают в себя соединения, описанные в общем выше, и их дополнительно иллюстрируют с помощью раскрытых в настоящем документе классов, подклассов и видов. Если не указано иное, должны применяться следующие определения, используемые в настоящем документе. Для целей настоящего изобретения химические элементы указаны в соответствии с периодической таблицей элементов, версии CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed. Кроме того, общие принципы органической химии описаны в "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, и "March's Advanced Organic Chemistry", 5th Ed., Ed.: Smith, M.B. and March, J., John Wiley & Sons, New York: 2001, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Если в пределах настоящего описания изобретения не определено иное, номенклатура, используемая в настоящем описании изобретения, как правило, соответствует примерам и правилам, установленным в Nomenclature of Organic Chemistry, Sections A, B, C, D, E, F, и H, Pergamon Press, Oxford, 1979, который включен посредством ссылки в настоящий документ для названий иллюстративных химических структур и правил названия химических структур. Необязательно, название соединения может быть создано с использованием программы создания химического названия: ACD/ChemSketch, версия 5.09/сентябрь 2001 г., Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canada.

Соединения согласно настоящему изобретению могут характеризоваться асимметричными центрами, хиральными осями и хиральными плоскостями (например, как описано в: E.L. Eliel and S.H. Wilen, Stereo-chemistry of Carbon Compounds, John Wiley & Sons, New York, 1994, pages 1119-1190), и существуют в виде рацематов, рацемических смесей и в виде отдельных диастереомеров или энантиомеров, со всеми возможными изомерами и их смесями, включая в себя оптические изомеры, будучи включенными в настоящее изобретение.

Используемый в настоящем документе термин "галоген" или "галоген" означает галоген и включает в себя, например, без ограничения фтор, хлор, бром, йод и подобное, как в радиоактивной, так и в нерадиоактивной формах.

Используемый в настоящем документе термин "алкил", если не указано иное, означает неразветвленные или разветвленные насыщенные одновалентные углеводородные радикалы, как правило C_1 - C_{12} ,

предпочтительно C_1 - C_6 . По существу, " C_1 - C_6 алкил" означает неразветвленный или разветвленный насыщенный одновалентный углеводородный радикал, характеризующийся от одного до шести атомов углерода (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6). Примеры алкильных групп включают в себя без ограничения метил, этил, пропил, изопропил и t-бутил.

Следует понимать, что заместители и паттерны замещения на соединениях согласно настоящему изобретению могут быть выбраны специалистом в настоящей области техники для получения соединений, которые являются химически стабильными и которые могут быть легко синтезированы с помощью техник, известных в настоящей области техники, а также тех способов, которые представлены ниже. Как правило, термин "замещенный", независимо от того, предшествует ли ему термин "необязательно" или нет, означает, что один или несколько атомов водорода обозначенной фрагмента замещены подходящим заместителем. Если не указано иное, "необязательно замещенная группа" может характеризоваться подходящим заместителем в каждом положении группы с возможностью замещения и, если больше одного положения в любой данной структуре может быть замещено больше чем одним заместителем, выбранным из указанной группы, заместитель может быть либо одинаковым, либо различным в каждом положении. Альтернативно, "необязательно замещенная группа" может быть незамещенной.

Комбинации заместителей, предусмотренных настоящим изобретением, предпочтительно представляют собой те, которые приводят к образованию стабильных или химически допустимых соединений. Если заместитель сам по себе замещен больше чем одной группой, следует понимать, что указанные множественные группы могут находиться на одном и том же атоме углерода или на различных атомах углерода, при условии, что в результате получается стабильная структура. Используемый в настоящем документе термин "стабильный" относится к соединениям, которые по существу не изменяются, когда их подвергают воздействию условий для обеспечения возможности их получения, обнаружения и согласно определенным вариантам осуществления их выделения, очищения и применения для одной или нескольких раскрытых в настоящем документе целей.

Подходящие одновалентные заместители на атоме углерода с возможностью замещения "необязательно замещенной группы" представляют собой независимо галоген; $-(CH_2)_{0-4}R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OR^\circ$; $-O(CH_2)_{0-4}R^\circ$; $-O-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}CH(OR^\circ)_2$; $-(CH_2)_{0-4}SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}Ph$, который может быть замещен R° ; $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}Ph$, который может быть замещен R° ; $-CH=CHPh$, который может быть замещен R° ; $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}$ -пиридил, который может быть замещен R° ; $-NO_2$; $-CN$; $-N_3$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)_2$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)C(S)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$; $-N(R^\circ)C(S)NR^\circ_2$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)OR^\circ$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)R^\circ$; $-C(S)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)OSiR^\circ_3$; $-(CH_2)_{0-4}OC(O)R^\circ$; $-OC(O)(CH_2)_{0-4}SR-SC(S)SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}SC(O)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)NR^\circ_2$; $-C(S)NR^\circ_2$; $-C(S)SR^\circ$; $-SC(S)SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OC(O)NR^\circ_2$; $-C(O)N(OR^\circ)R^\circ$; $-C(O)C(O)R^\circ$; $-C(O)CH_2C(O)R^\circ$; $-C(NOR^\circ)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}SSR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OS(O)_2R^\circ$; $-S(O)_2NR^\circ_2$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)S(O)_2NR^\circ_2$; $-N(R^\circ)S(O)_2R^\circ$; $-N(OR^\circ)R^\circ$; $-C(NH)NR^\circ_2$; $-P(O)_2R^\circ$; $-P(O)R^\circ$; $-OP(O)R^\circ$; $-OP(O)(OR^\circ)_2$; SiR°_3 ; $-(C_{1-4}$ неразветвленный или разветвленный алкилен)O-N(R°) $_2$; или $-(C_{1-4}$ неразветвленный или разветвленный алкилен)C(O)O-N(R°) $_2$, причем каждый R° может быть замещен, как определено ниже, и представлять собой независимо водород, C_{1-6} алифатический радикал, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$, $-CH_2$ -(5-6 членное гетероарильное кольцо) или 5-6-членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, характеризующееся 0-4 гетероатомами, независимо выбранными из азота, кислорода и серы или, независимо от определения выше, два независимых R° , взятые вместе со своим(и) промежуточным(и) атомом(ами), образуют 3-12-членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное моноциклическое или бициклическое кольцо, характеризующееся 0-4 гетероатомами, независимо выбранными из азота, кислорода и серы, которые могут быть замещены, как определено ниже.

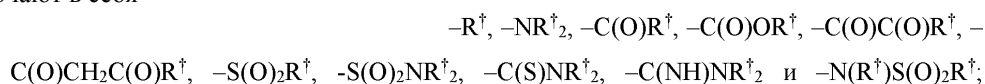
Подходящие одновалентные заместители на R° (или кольцо, образованном объединением двух независимых R° вместе с их промежуточными атомами), представляют собой независимо галоген, $-(CH_2)_{0-2}R^\bullet$, $-(\text{гало } R^\bullet)$, $-(CH_2)_{0-2}OH$, $-(CH_2)_{0-2}OR^\bullet$, $-(CH_2)_{0-2}CH(OR^\bullet)_2$; $-O(\text{гало } R^\bullet)$, $-CN$, $-N_3$, $-(CH_2)_{0-2}C(O)R^\bullet$, $-(CH_2)_{0-2}C(O)OH$, $-(CH_2)_{0-2}C(O)OR^\bullet$, $-(CH_2)_{0-2}SR^\bullet$, $-(CH_2)_{0-2}SH$, $-(CH_2)_{0-2}NH_2$, $-(CH_2)_{0-2}NHR^\bullet$, $-(CH_2)_{0-2}NR^\bullet_2$, $-NO_2$, $-SiR^\bullet_3$, $-OSiR^\bullet_3$, $-C(O)SR^\bullet$, $-(C_{1-4}$ неразветвленный или разветвленный алкилен)C(O)OR $^\bullet$ или $-SSR^\bullet$, причем каждый $R^\bullet$ является незамещенным или, если ему предшествует термин "гало", замещен только одним или несколькими галогенами и независимо выбран из C_{1-4} алифатического радикала, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$ или 5-6-членного насыщенного, частично ненасыщенного или арильного кольца, характеризующегося 0-4 гетероатомами, независимо выбранными из азота, кислорода и серы. Подходящие двухвалентные заместители на насыщенном атоме углерода R° включают в себя $=O$ и $=S$.

Подходящие двухвалентные заместители на насыщенном атоме углерода "необязательно замещенной группы" включают в себя следующее: $=O$, $=S$, $=NNR^*_2$, $=NNHC(O)R^*$, $=NNHC(O)OR^*$, $=NNHS(O)_2R^*$, $=NR^*$, $=NOR^*$, $-O(C(R^*_2))_{2-3}O-$ и $-S(C(R^*_2))_{2-3}S-$, причем каждый независимый R^* выбран из водорода, C_{1-6} алифатического радикала, который может быть замещен, как определено ниже, или незамещенного 5-6-членного насыщенного, частично ненасыщенного или арильного кольца, характери-

зующегося 0-4 гетероатомами, независимо выбранными из азота, кислорода и серы. Подходящие двухвалентные заместители, которые связаны с соседними атомами углерода с возможностью замещения "необязательно замещенной" группы, включают в себя: $-\text{O}(\text{CR}^*)_{2-3}\text{O}-$, причем каждый независимый R^* выбран из водорода, C_{1-6} алифатического радикала, который может быть замещен, как определено ниже, или незамещенного 5-6-членного насыщенного, частично ненасыщенного или арильного кольца, характеризующегося 0-4 гетероатомами, независимо выбранными из азота, кислорода и серы.

Подходящие заместители на алифатической группе R^* включают в себя галоген, $-\text{R}^*$, $-(\text{гало } \text{R}^*)$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}^*$, $-\text{O}(\text{гало } \text{R}^*)$, $-\text{CN}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^*$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}^*$, $-\text{NR}^{*2}$, и $-\text{NO}_2$, причем каждый R^* является незамещенным или, если ему предшествует термин "гало", замещен только одним или несколькими галогенами и представляет собой независимо C_{1-4} алифатический радикал, $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$ или 5-6-членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, характеризующееся 0-4 гетероатомами, независимо выбранными из азота, кислорода и серы.

Подходящие заместители на азоте с возможностью замещения "необязательно замещенной группы" включают в себя



причем каждый $\text{R}^\dagger$ представляется собой независимо водород, C_{1-6} алифатический радикал, который может быть замещен, как определено ниже, незамещенный $-\text{OPh}$ или незамещенное 5-6-членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, характеризующееся 0-4 гетероатомами, независимо выбранными из азота, кислорода и серы, или, независимо от определения выше, два независимых $\text{R}^\dagger$ взятые вместе с их промежуточным(и) атомом(ами) образуют незамещенное 3-12-членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное моноциклическое или бициклическое кольцо, характеризующееся 0-4 гетероатомами, независимо выбранными из азота, кислорода и серы.

Подходящие заместители на алифатической группе $\text{R}^\dagger$ представляют собой независимо галоген, $-\text{R}^\dagger$, $-(\text{гало } \text{R}^\dagger)$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}^\dagger$, $-\text{O}(\text{гало } \text{R}^\dagger)$, $-\text{CN}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^\dagger$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}^\dagger$, $-\text{NR}^{\dagger 2}$ или $-\text{NO}_2$, причем каждый $\text{R}^\dagger$ является незамещенным или, если ему предшествует термин "гало", замещен только одним или несколькими галогенами и представляет собой независимо C_{1-4} алифатический радикал, $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$ или 5-6-членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, характеризующееся 0-4 гетероатомами, независимо выбранными из азота, кислорода и серы.

Предпочтительные заместители на гетероариле могут быть выбраны из группы, состоящей из следующего: $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, нитро, галоген, амино, циано, $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ алкил, $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ алкенил, $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ алкинил, $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ алкокси, $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ галоалкил, $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ галоалкокси и $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ алкилсульфанил. Предпочтительные заместители на алкиле, алкилене и гетероциклиле включают в себя предпочтительные заместители на гетероариле и оксо. Согласно одному варианту осуществления заместитель на алкиле, алкилене, гетероциклиле или гетероариле представляет собой аминогруппу, характеризующуюся формулой $-\text{N}(\text{R}^5)_2$, где каждый R^5 независимо выбран из водорода и $\text{C}_1\text{-C}_4$ алкила.

Заместители на алкиле, алкилене, гетероциклиле и гетероариле могут быть выбраны из следующего: $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, нитро, галоген, амино, циано, $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ алкил, $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ алкенил, группа $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ алкинила, $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ алкокси, $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ галоалкил, $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ галоалкокси и $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ алкилсульфанил. Согласно одному варианту осуществления заместитель представляет собой аминогруппу, характеризующуюся формулой $-\text{N}(\text{R}^5)_2$, где каждый R^5 независимо выбран из водорода и $\text{C}_1\text{-C}_4$ алкила.

Используемый в настоящем документе термин "циклоалкил" означает насыщенные циклические углеводороды, т.е. соединения, где все атомы кольца представляют собой углеводы. Примеры циклоалкила включают в себя без ограничения циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и циклогептил. Согласно некоторым вариантам осуществления циклоалкил может быть необязательно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из следующего: $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, галоген, амино, нитро, циано, $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ алкил, группа $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ алкенила или $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ алкинила, $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ алкокси, $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ галоалкил и $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ галоалкокси.

Используемый в настоящем документе термин "гетероарил" относится к ароматическим группам, содержащим один или несколько гетероатомов (O, S, или N). Гетероарильная группа может являться моноциклической или полициклической, например моноциклическое гетероарильное кольцо, слитое с одним или несколькими карбоциклическими ароматическими группами или другими моноциклическими гетероарильными группами. Гетероарильные группы согласно настоящему изобретению также могут включать в себя системы колец, замещенные одним или несколькими фрагментами оксо. Примеры гетероарильных групп включают в себя без ограничения пиридинил, пиридазинил, имидазолил, пиримидинил, пиразолил, триазолил, пиразинил, хинолил, изохинолил, тетразолил, фурил, тиенил, изоксазолил, тиазолил, оксазолил, изотиазолил, пирролил, хинолинил, изохинолинил, индолил, бензимидазолил, бензофуранил, циннолинил, индазолил, индолизинил, фталазинил, пиридазинил, триазинил, изоиндолил, пуринил, оксадиазолил, тиазолил, тиадиазолил, фуразанил, бензофуразанил, бензотиофенил, бензотриазолил, бензотиазолил, бензоксазолил, хиназолинил, хиноксалинил, нафтиридинил, дигидрохинолил, тет-

рагидрохинолил, дигидроизохинолил, тетрагидроизохинолил, бензофурил, фуropyридинил, пиролопи-
римидинил и азаиндолил.

Вышеперечисленные гетероарильные группы могут являться С-прикрепленными или N-
прикрепленными (если такое возможно). Например, группа, происходящая от пиррола, может представ-
лять собой пиррол-1-ил (N-прикрепленная) или пиррол-3-ил (С-прикрепленная).

"Гетероцикл" означает циклическое 4-13-членное насыщенное или ненасыщенное алифатическое
кольцо, содержащее 1, 2, 3, 4 или 5 гетероатомов, независимо выбранных из N, O или S. Если один гете-
роатом представляет собой S, он может быть необязательно моно- или диокисленным (т.е. -S(O)- или
-S(O)₂-). Гетероцикл может являться моноциклическим, слитым бициклическим, соединенным мости-
ком бициклическим, спиробициклическим или полициклическим.

"Оксо" означает =O.

Используемый в настоящем документе термин "алкенил" означает насыщенную неразветвленную
цепь или разветвленный нециклический углеводород, характеризующийся 2-12 атомами углерода и ха-
рактеризующийся по меньшей мере одной углерод-углеродной двойной связью. Алкенильные группы
могут быть необязательно замещены одним или несколькими заместителями.

Используемый в настоящем документе термин "алкинил" означает насыщенную неразветвленную
цепь или разветвленный нециклический углеводород, характеризующийся 2-12 атомами углерода и ха-
рактеризующийся по меньшей мере одной углерод-углеродной тройной связью. Алкинильные группы
могут быть необязательно замещены одним или несколькими заместителями.

Используемый в настоящем документе термин "алкилен" относится к алкильной группе, которая
содержит два места прикрепления к остальному соединению. Неограничивающие примеры алкиленовых
групп включают в себя метилен (-CH₂-), этилен (-CH₂CH₂-), n-пропилен (-CH₂CH₂CH₂-), изопропилен
(-CH₂CH(CH₃)-) и подобное. Алкиленовые группы могут быть необязательно замещены одним или не-
сколькими заместителями.

Используемый в настоящем документе термин "галоалкил" включает в себя алкил, замещенный од-
ним или несколькими F, Cl, Br или I, причем алкил определен выше.

Используемые в настоящем документе термины "алкокси" означают группу "алкил-O-", причем ал-
кил определен выше. Примеры группы алкокси включают в себя группы метокси или этокси.

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к
тем солям, которые в пределах тщательной медицинской оценки являются подходящими для применения
в контакте с тканями людей и животных без неспецифической токсичности, раздражения, аллергической
реакции и подобного и являются адекватными с обоснованным отношением риск/польза. Фармацевтиче-
ски приемлемые соли хорошо известны в настоящей области техники. Например, S.M. Berge с соавт. по-
дробно описывают фармацевтически приемлемые соли в J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19, вклю-
ченной в настоящий документ посредством ссылки. Фармацевтически приемлемые соли соединений со-
гласно настоящему изобретению включают в себя соли, полученные из подходящих неорганических и
органических кислот и оснований. Примеры фармацевтически приемлемых, нетоксических солей при-
соединения кислоты представляют собой соли аминогруппы, образованной с такими неорганическими
кислотами, как соляная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и пер-
хлорная кислота, или такими органическими кислотами, как уксусная кислота, трифторуксусная кислота
(2,2,2-трифторуксусная кислота), щавелевая кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная ки-
слота, янтарная кислота или малоновая кислота, или с применением других способов, используемых в
настоящей области техники, таких как ионный обмен. Другие фармацевтически приемлемые соли вклю-
чают в себя такие соли, как адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат,
борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсуль-
фат, этансульфонат, формиат, fumarat, глюкогоптонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептано-
ат, гексаноат, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, манат,
малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат,
памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, суль-
фат, тартрат, тиоцианат, p-толуолсульфонат, трифторацетат (2,2,2-трифторацетат), ундеканоат, валерат и
подобное.

Соли, полученные из соответствующих оснований, включают в себя соли щелочных металлов, ще-
лочно-земельных металлов, соли аммония и N⁺(C₁₋₄алкила)₄. Репрезентативные соли щелочных и щелоч-
но-земельных металлов включают в себя соли натрия, лития, калия, кальция, магния и подобное. Дополни-
тельные фармацевтически приемлемые соли включают в себя, в соответствующих случаях, нетоксиче-
ские катионы аммония, четвертичного аммония и амина, образованные с использованием таких противо-
ионов, как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, низший алкилсульфонат и арил-
сульфонат.

Если не установлено иное, предусмотрено, что структуры, представленные в настоящем документе,
также включают в себя все изомерные (например, энантиомерные, диастереомерные и геометрические
(или конформационные)) формы структуры; например конфигурации R и S для каждого асимметричного
центра, изомеры двойной связи Z и E и конформационные изомеры Z и E. Следовательно, отдельные

стереохимические изомеры, а также энантиомерные, диастереомерные и геометрические (или конформационные) смеси настоящих соединений находятся в пределах объема настоящего изобретения. Если не установлено иное, все таутомерные формы соединений согласно настоящему изобретению находятся в пределах объема настоящего изобретения. Кроме того, если не установлено иное, предусмотрено, что структуры, изложенные в настоящем документе, также включают в себя соединения, которые различаются только в отношении присутствия одного или нескольких изотопно обогащенных атомов. Например, соединения, характеризующиеся настоящими структурами, включая в себя замещение водорода дейтерием или тритием, или замещение углерода ^{13}C - или ^{14}C -обогащенным углеродом, находятся в пределах объема настоящего изобретения. Такие соединения применимы, например, в качестве аналитических инструментов, в качестве зондов в биологических исследованиях или в качестве терапевтических средств согласно настоящему изобретению.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" означает либо соль присоединения кислоты, либо соль присоединения основания, которая совместима с лечением пациентов.

Согласно некоторым вариантам осуществления иллюстративные неорганические кислоты, которые образуют подходящие соли включают в себя без ограничения соляную, бромистоводородную, серную и фосфорную кислоту и соли кислоты и металла, такие как моногидроортофосфат натрия и гидросульфат калия. Иллюстративные органические кислоты, которые образуют подходящие соли, включают в себя моно-, ди- и трикарбоновые кислоты. Иллюстративные примеры таких кислот представляют собой, например, уксусную, трифторуксусную кислоту (2,2,2-трифторуксусную кислоту), гликолевую, молочную, пировиноградную, малоновую, янтарную, глутаровую, фумаровую, яблочную, винную, лимонную, аскорбиновую, малеиновую, гидроксималеиновую, бензойную, гидроксibenзойную, фенилуксусную, коричную, салициловую, 2-феноксибензойную, *p*-толуолсульфоновую кислоту и другие сульфоновые кислоты, такие как метансульфоновая кислота и 2-гидроксиэтансульфоновая кислота. Могут быть образованы либо моно-, либо дикислотные соли, и такие соли могут существовать или в гидратированной, сольватированной или, по существу, безводной форме. Как правило, соли присоединения кислоты указанных соединений более растворимы в воде и различных гидрофильных органических растворителях и, как правило, демонстрируют повышенные точки плавления по сравнению с их формами свободных оснований. Другие соли, не относящиеся к фармацевтически приемлемым солям, например оксалаты, можно использовать, например, в выделении соединений формулы I для лабораторного применения или для последующего превращения в фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты.

"Фармацевтически приемлемая соль присоединения основания" представляет собой любую нетоксическую органическую или неорганическую соль присоединения основания кислотных соединений, представленных формулой I, или любые ее промежуточные соединения. Иллюстративные неорганические основания, которые образуют подходящие соли, включают в себя без ограничения гидроксиды лития, натрия, калия, кальция, магния или бария. Иллюстративные органические основания, которые образуют подходящие соли, включают в себя алифатические, алициклические или ароматические органические амины, такие как метиламин, триметиламин и пиколин или аммиак. Может быть важным выбрать соответствующую соль так, чтобы функциональная группа сложного эфира, если она вообще присутствует где-либо в молекуле, не гидролизвалась. Критерии выбора соответствующей соли будут известны специалисту в настоящей области техники.

Соли присоединения кислоты соединений формулы I наиболее приемлемо образованы из фармацевтически приемлемых кислот и включают в себя, например, соли, образованные с помощью неорганических кислот, например соляной, серной или фосфорной кислот, и органических кислот, например янтарной, малеиновой, уксусной, трифторуксусной или фумаровой кислоты. Другие соли, не относящиеся к фармацевтически приемлемым солям, например оксалаты, могут применяться, например, в выделении соединений формулы I для лабораторного применения или для последующего превращения в фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты. Также в пределах объема настоящего изобретения предусмотрены соли присоединения основания (такие как соли натрия, калия и аммония), сольваты и гидраты соединений согласно настоящему изобретению. Превращение данной соли соединения в требуемую соль соединения достигается применением стандартных техник, хорошо известных специалисту в настоящей области техники.

Термин "стереоизомеры" представляет собой общий термин для всех изомеров отдельных молекул, которые отличаются только в ориентации своих атомов в пространстве. Он включает в себя зеркальные изомеры (энантиомеры), геометрические (цис/транс) изомеры и изомеры соединений с более чем одним хиральным центром, которые не являются зеркальными отображениями друг друга (диастереомеры).

Термин "лечить" или "лечение" означает облегчать симптомы, устранять причину симптомов либо на временной, либо на постоянной основе или предотвращать или замедлять появление симптомов указанного нарушения или состояния.

Термин "терапевтически эффективное количество" означает количество соединения, которое является эффективным в лечении или уменьшении тяжести одного или нескольких симптомов нарушения или состояния.

При введении элементов, раскрытых в настоящем документе, подразумевается, что формы единст-

венного числа и "указанный" обозначают, что существует один или несколько элементов. Предусмотрено, что термины "содержащий", "характеризующийся", "включая в себя" являются неограниченными и подразумевают, что могут существовать дополнительные элементы, отличные от перечисленных элементов.

Применения, состав и введение.

Фармацевтически приемлемые композиции.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение включает композицию, содержащую соединение согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемое производное и фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или инертный носитель. Количество соединения в композициях согласно настоящему изобретению является таким, чтобы быть эффективным для заметного ингибирования CRM1, в биологическом образце или у пациента. Согласно определенным вариантам осуществления композиция согласно настоящему изобретению составлена для введения пациенту, нуждающемуся в такой композиции. Используемый в настоящем документе термин "пациент" означает животное. Согласно некоторым вариантам осуществления животное представляет собой млекопитающего. Согласно определенным вариантам осуществления пациент представляет собой ветеринарного пациента (т.е. не относящегося к человеку пациента млекопитающего). Согласно некоторым вариантам осуществления пациент представляет собой собаку. Согласно другим вариантам осуществления пациент представляет собой человека.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или инертный носитель" относится к нетоксическому носителю, адъюванту или инертному носителю, который не нарушает фармакологической активности соединения, с которым оно введено в состав. Фармацевтически приемлемые носители, адъюванты или инертные носители, которые можно использовать в композициях согласно настоящему изобретению, включают в себя без ограничения ионные обменники, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, такие сывороточные белки, как сывороточный альбумин человека, такие буферные вещества, как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, смеси неполного глицерида и насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как протаминсульфат, дигидрофосфат натрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидная двуокись кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, карбоксиметилцеллюлоза натрия, полиакрилаты, воски, блок-полимеры полиэтилена и полиоксипропилена, полиэтиленгликоль и ланолин.

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть введены перорально, парентерально (включая в себя подкожный, внутримышечный, внутривенный и внутрикожный путь), с помощью спрея для ингаляции, местно, ректально, назально, буккально, вагинально или посредством имплантированной емкости. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренные соединения или композиции могут быть введены внутривенно и/или интраперитонеально.

Используемый в настоящем документе термин "парентеральный" включает в себя техники подкожной, внутривенной, внутримышечной, интраокулярной, интравентриальной, интраартикулярной, интрасиновиальной, интратеральной, интратекальной, внутривенной, интраперитонеальной, внутриочаговой и интракраниальной инъекции или инфузии. Предпочтительно композиции вводят перорально, подкожно, интраперитонеально или внутривенно. Стерильные формы для инъекции композиций согласно настоящему изобретению могут представлять собой водную или масляную суспензию. Указанные суспензии могут быть составлены согласно техникам, известным в настоящей области техники, с применением подходящих диспергирующих или смачивающих средств и суспендирующих средств. Стерильный препарат для инъекции также может представлять собой стерильный раствор или суспензию для инъекции в нетоксическом парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, как раствор в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых инертных носителей и растворителей, которые можно использовать, вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, стерильные, нелетучие масла традиционно используются в качестве растворителя или суспендирующей среды.

Фармацевтически приемлемые композиции согласно настоящему изобретению могут быть введены перорально в любой перорально приемлемой лекарственной форме, включая в себя без ограничения капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. В случае таблеток для перорального применения широко используемые носители включают в себя лактозу и кукурузный крахмал. Как правило, также добавляют способствующие скольжению средства, такие как стеарат магния. Для перорального введения в форме капсулы применимые разбавители включают в себя лактозу и высушенный кукурузный крахмал. Если водные суспензии требуются для перорального применения, активный ингредиент комбинируют с эмульгирующими и суспендирующими средствами. При необходимости также могут быть добавлены определенные подсластители, ароматизаторы или красители. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренный пероральный состав составляют для немедленного высвобождения или пролонгированного/замедленного высвобождения. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция является подходящей для буккального или сублингвального введения, включая в себя таблетки, леденцы и пастилки. Предусмотренные соединения также могут быть в микроинкапсулированной форме.

Альтернативно, фармацевтически приемлемые композиции согласно настоящему изобретению мо-

гут быть введены в форме суппозитория для ректального введения. Фармацевтически приемлемые композиции согласно настоящему изобретению также могут быть введены местно, особенно когда цель лечения включает в себя области или органы, легко доступные путем местного нанесения, включая в себя заболевания глаза, кожи или нижних отделов желудочно-кишечного тракта. Подходящие местные составы легко получить для каждой из указанных областей или органов.

Местное нанесение для нижних отделов желудочно-кишечного тракта можно осуществить в составе ректального суппозитория (см. выше) или в подходящем составе клизмы. Также можно использовать местные трансдермальные пластыри.

Для офтальмологического применения предусмотренные фармацевтически приемлемые композиции могут быть составлены в виде микронизированных суспензий или введен в состав такой мази, как вазелин.

Фармацевтически приемлемые композиции согласно настоящему изобретению также могут быть введены с помощью назального аэрозоля или ингаляции.

Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтически приемлемые композиции согласно настоящему изобретению составляют для интраперитонеального введения.

Количество соединений согласно настоящему изобретению, которые можно комбинировать с материалами-носителями для получения композиции в отдельной лекарственной форме, будут варьировать в зависимости от получающего лечение хозяина, конкретного пути введения. Согласно одному варианту осуществления предусмотренные композиции должны быть составлены так, чтобы дозировка 0,01-100 мг/кг массы тела/день ингибитора могла быть введена пациенту, получающему указанные композиции. Согласно другому варианту осуществления дозировка составляет от приблизительно 0,5 до приблизительно 100 мг/кг массы тела или от 1 мг до 1000 мг/доза, каждые 4-120 ч или согласно требованиям в отношении конкретного лекарственного средства. Как правило, фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению будут вводиться приблизительно 1 - приблизительно 6 раз в день.

Также следует понимать, что конкретная дозировка и схема лечения для любого конкретного пациента будет зависеть от различных факторов, включая в себя активность конкретного используемого соединения, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, рацион питания, время введение, скорость выведения, комбинацию лекарственных средств и соображения лечащего врача и тяжести конкретного подлежащего лечению заболевания. Количество соединения согласно настоящему изобретению в композиции также будет зависеть от конкретного соединения в композиции.

При улучшении состояния пациента при необходимости может быть введена поддерживающая доза соединения, композиции или комбинации согласно настоящему изобретению. Впоследствии дозировка или частота введения или и то и другое могут быть снижены в зависимости от симптомов, уровня, на котором удерживается улучшенное состояние, когда симптомы были ослаблены до требуемого уровня. Пациенты могут, тем не менее, нуждаться в прерывистом лечении на долговременной основе при любом рецидиве симптомов заболевания.

Применения соединений и фармацевтически приемлемых композиций.

Описанные в настоящем документе соединения и композиции, как правило, применимы для ингибирования CRM1 и, следовательно, применимы для лечения одного или нескольких нарушений, связанных с активностью CRM1. Таким образом, согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение включает способ лечения опосредованного CRM1 нарушения, включающий стадию введения нуждающемуся в этом пациенту соединения согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой композиции. Описанные в настоящем документе соединения и композиции также могут быть введены в клетки в культуре, например, *in vitro* или *ex vivo*, или субъекту, например, *in vivo*, для лечения, профилактики и/или диагностики разнообразных нарушений, включая в себя описанные в настоящем документе ниже нарушения.

Активность соединений, используемых в настоящем изобретении в качестве ингибитора CRM1, может быть оценена *in vitro*, *in vivo* или в клеточной линии. Подробные условия для оценки соединения, используемого в настоящем изобретении в качестве ингибитора CRM1, представлены в примерах ниже.

Используемый в настоящем документе термин "опосредованное CRM1" нарушение или состояние означает любое заболевание или другое неблагоприятное состояние, в котором, как известно, играет роль CRM1. Соответственно, другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к лечению или уменьшению тяжести одного или нескольких заболеваний, в которых, как известно, играет роль CRM1. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение включает способы лечения заболевания, связанного с экспрессией или активностью p53, p73, p21, pRB, p27, IκB, NFκB, c-Abl, белков FOXO, COX-2 или HDAC (гистондеацетилазы) у субъекта, включающие введение пациенту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе соединения. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или уменьшения тяжести заболевания или состояния, выбранного из пролиферативного нарушения (например, злокачественной опухоли), воспалительного нарушения, аутоиммунного нарушения, вирусной инфекции, офтальмологического нарушения или нейродегенеративного нарушения, причем указанный способ включает введение нуждающемуся в этом пациенту соединения или композиции согласно настоящему изобретению. Со-

гласно более конкретному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или уменьшения тяжести злокачественной опухоли. Конкретные примеры вышеизложенных нарушений подробно представлены ниже.

Злокачественные опухоли, поддающиеся лечению с помощью соединений согласно настоящему изобретению, включают в себя без ограничения гематологические злокачественные опухоли (лейкозы, лимфомы, миеломы, включая в себя множественную миелому, миелодиспластические и миелопролиферативные синдромы) и солидные опухоли (такие карциномы, как карциномы предстательной железы, молочной железы, легких, толстого кишечника, поджелудочной железы, почки, яичника, а также мягких тканей и остеосаркомы и стромальные опухоли). Рак молочной железы (BC) может включать в себя базальноподобный рак молочной железы (BLBC), трижды негативный рак молочной железы (TNBC) и рак молочной железы, который является как BLBC, так и TNBC. Кроме того, рак молочной железы может включать в себя инвазивную или неинвазивную протоковую или дольковую карциному, тубулярную, медуллярную, слизеподобную, папиллярную, криброзную карциному молочной железы, рак молочной железы у мужчин, рецидивирующий или метастатический рак молочной железы, филоидную цистосаркому молочной железы и рак соска Педжета.

Воспалительные нарушения, поддающиеся лечению с помощью соединений согласно настоящему изобретению, включают в себя без ограничения рассеянный склероз, ревматоидный артрит, дегенеративное заболевание сустава, системная красная волчанка, системный склероз, синдромы васкулита (мелких, средних и больших сосудов), атеросклероз, воспалительное заболевание кишечника, синдром раздраженного кишечника, болезнь Крона, слизистый колит, язвенный колит, гастрит, сепсис, псориаз и другие дерматологические воспалительные нарушения (такие как экзема, атопический дерматит, контактный дерматит, крапивница, склеродермия и дерматоз с острыми воспалительными компонентами, пузырчатка, пемфигоид, аллергический дерматит) и относящиеся к крапивнице синдромы.

Вирусные заболевания, поддающиеся лечению с помощью соединений согласно настоящему изобретению, включают в себя без ограничения острый лихорадочный фарингит, фарингоконъюнктивит, эпидемический кератоконъюнктивит, детский гастроэнтерит, инфекции Коксаки, инфекционный мононуклеоз, лимфому Беркита, острый гепатит, хронический гепатит, цирроз печени, гепатоклеточную карциному, первичную инфекцию HSV-1 (например, гингивостоматит у детей, тонзиллит и фарингит у взрослых, кератоконъюнктивит), латентную инфекцию HSV-1 (например, герпес губы и герпетические лихорадки), первичную инфекцию HSV-2, латентную инфекцию HSV-2, асептический менингит, инфекционный мононуклеоз, инклюзионную цитомегалию, саркому Капоши, многоочаговую болезнь Кастлемана, первичную эффузионную лимфому, СПИД, грипп, синдром Рейе, корь, постинфекционный энцефаломиелит, паротит, гиперпластические эпителиальные поражения (например, обыкновенные, плоские, подошвенные и аногенитальные бородавки, папилломы гортани, бородавчатая эпидермодисплазия), карциному шейки матки, плоскоклеточные карциномы, круп, воспаление легких, бронхиолит, простуду, полиомиелит, бешенство, гриппоподобный синдром, тяжелый бронхиолит с воспалением легких, коревую краснуху, врожденную краснуху, ветряную оспу и опоясывающий герпес. Вирусные заболевания, поддающиеся лечению с помощью соединений согласно настоящему изобретению, также включают в себя хронические вирусные инфекции, включая в себя гепатит В и гепатит С.

Иллюстративные офтальмологические нарушения включают в себя без ограничения следующее: макулярный отек (диабетический и недиабетический макулярный отек), возрастная макулярная дегенерация, влажная и сухая формы, возрастная дисковидная макулярная дегенерация, кистозный макулярный отек, пальпебральный отек, отек сетчатки, диабетическая ретинопатия, хориоретинопатия, неоваскулярная макулопатия, неоваскулярная глаукома, увеит, ирит, ретинальный васкулит, эндофтальмит, панеофтальмит, метастатическая офтальмия, хороидит, ретинальный пигментный эпителиит, конъюнктивит, циклит, склерит, эписклерит, неврит зрительного нерва, ретробульбарный неврит зрительного нерва, кератит, блефарит, экссудативное отслоение сетчатки, язва роговицы, язва конъюнктивы, хронический нуммулярный кератит, связанное с гипоксией или ишемией офтальмологическое заболевание, ретинопатия недоношенных, пролиферативная диабетическая ретинопатия, полипообразная хориоидальная васкулопатия, ретинальная ангиоматозная пролиферация, окклюзия ретинальных артерий, окклюзия ретинальных вен, болезнь Коутса, семейная экссудативная витреоретинопатия, болезнь отсутствия пульса (болезнь Такаецу), болезнь Илза, синдром антифосфолипидных антител, лейкомическая ретинопатия, синдром повышенной вязкости крови, макроглобулинемия, интерферон-ассоциированная ретинопатия, гипертензивная ретинопатия, лучевая ретинопатия, дефицит стволовых эпителиальных клеток роговицы или катаракта.

Нейродегенеративные заболевания, поддающиеся лечению с помощью соединения формулы I, включают в себя без ограничения болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и болезнь Хантингтона и амиотрофический латеральный склероз (ALS/болезнь Лу Герига).

Описанные в настоящем документе соединения и композиции также можно использовать для лечения нарушений аномального роста тканей и фиброза, включая в себя следующее: расширяющаяся кардиомиопатия, гипертрофическая кардиомиопатия, рестриктивная кардиомиопатия, фиброз легких, фиброз печени, гломерулонефрит, поликистозное нарушение почек (PKD) и другие нарушения почек.

Описанные в настоящем документе соединения и композиции также можно использовать для лечения нарушений, связанных с приемом пищи, таких как ожирение и гиперфагия.

Согласно другому варианту осуществления описанное в настоящем документе соединение или композиция можно использовать для лечения или профилактики аллергий и респираторных нарушений, включая в себя бронхиальную астму, бронхит, фиброз легких, аллергический ринит, кислородную токсичность, эмфизему, хронический бронхит, синдром острой дыхательной недостаточности и любое хроническое обструктивное заболевание легких (COPD).

Согласно некоторым вариантам осуществления нарушение или состояние, связанное с активностью CRM1, представляет собой следующее: мышечная дистрофия, артрит, например остеоартрит и ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, ревматическое повреждение головного мозга, повреждение спинного мозга, сепсис, ревматическое заболевание, злокачественный атеросклероз, сахарный диабет 1 типа, сахарный диабет 2 типа, лептоспирозное заболевание почек, глаукома, заболевание сетчатки, старение, головная боль, боль, комплексный региональный болевой синдром, гипертрофия сердца, мышечная атрофия, катаболические нарушения, ожирение, задержка развития плода, гиперхолестеринемия, заболевание сердца, хроническая сердечная недостаточность, ишемия/реперфузия, острое нарушение мозгового кровообращения, аневризма сосудов головного мозга, стенокардия, заболевание легких, кистозный фиброз, индуцированное кислотами повреждение легких, легочная гипертензия, бронхиальная астма, хроническое обструктивное заболевание легких, синдром Шегрена, синдром гиалиновых мембран, заболевание почек, гломерулярная болезнь, алкогольная болезнь печени, заболевания кишечника, перитонеальный эндометриоз, заболевания кожи, назальный синусит, мезотелиома, ангиодротическая эктодермальная дисплазия-ID, болезнь Бехчета, инфантильный пигментный дерматоз, туберкулез, бронхиальная астма, болезнь Крона, колит, аллергическое заболевание глаза, аппендицит, болезнь Педжета, панкреатит, периодонтит, эндометриоз, воспалительное заболевание кишечника, воспалительное заболевание легких, индуцированные кремнеземом заболевания, апноэ во сне, СПИД, ВИЧ-1, аутоиммунные заболевания, антифосфолипидный синдром, красная волчанка, волчаночный нефрит, семейная мальтийская лихорадка, наследственный синдром периодической лихорадки, заболевания в связи с психосоциальным стрессом, нейропатологические заболевания, семейная амилоидотическая полинейропатия, воспалительная нейропатия, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера, амиотрофический латеральный склероз, болезнь Хантингтона, катаракты или потеря слуха.

Согласно другим вариантам осуществления нарушение или состояние, связанное с активностью CRM1, представляет собой следующее: травма головы, увеит, боль при воспалении, индуцированная аллергенами бронхиальная астма, не индуцированная аллергенами бронхиальная астма, гломерулярный нефрит, язвенный колит, некротизирующий энтероколит, гипериммуноглобулинемия D с рецидивирующей лихорадкой (HIDS), связанный с рецепторами TNF периодический синдром (TRAPS), связанные с криопирином периодические синдромы, синдром Макла-Уэльса (крапивница, глухота, амилоидоз), семейная холодовая крапивница, мультисистемное воспалительное заболевание неонатального возраста (NOMID), периодическая лихорадка, афтозный стоматит, фарингит и аденит (синдром PFAPA), синдром Блау, пиогенный стерильный артрит, гангренозная пиодермия, акне (PAPA), дефицит антагониста рецептора интерлейкина-1 (DIRA), субарахноидальное кровоизлияние, поликистозное заболевание почек, трансплантация, трансплантация органа, трансплантация ткани, миелодиспластический синдром, индуцированное раздражающим агентом воспаление, индуцированное растительным раздражающим агентом воспаление, индуцированное сумахом ядовитым/маслом урушиола воспаление, индуцированное химическим раздражающим агентом воспаление, индуцированное пчелиным жалом воспаление, индуцированное укусом насекомого воспаление, солнечный ожог, ожоги, дерматит, эндотоксемия, повреждение легких, синдром острой дыхательной недостаточности, алкогольный гепатит или повреждение почек, вызванное паразитарными инфекциями.

Согласно дополнительным аспектам настоящее изобретение включает применение соединения формулы I для получения лекарственного средства для лечения заболевания, связанного с экспрессией или активностью белков p53, p73, p21, pRB, p27, IκB, NFκB, c-Abl, белков FOXO, COX-2 или HDAC у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение включает применение соединения формулы I в получении лекарственного средства для лечения любого из злокачественных и/или неопластических нарушений, ангиогенеза, аутоиммунных нарушений, воспалительных нарушений и/или заболеваний, эпигенетики, гормональных нарушений и/или заболеваний, вирусных заболеваний, нейродегенеративных нарушений и/или заболеваний, ран и офтальмологических нарушений.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение включает способ ингибирования CRM1 в биологическом образце, включающий контакт биологического образца или введение пациенту фармацевтически приемлемой соли соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой композиции.

Неопластические нарушения.

Описанное в настоящем документе соединение или композиция может применяться для лечения неопластического нарушения. "Неопластическое нарушение" представляет собой заболевание или нарушение, характеризующееся клетками, которые обладают способностью к автономному росту или репли-

кации, например аномальному состоянию или состоянию, характеризующемуся пролиферативным клеточным ростом. Иллюстративные неопластические нарушения включают в себя следующее: карцинома, саркома, метастатические нарушения, например опухоли, происходящие из предстательной железы, головного мозга, кости, толстой кишки, легких, молочной железы, яичников и печени, гематопластические неопластические нарушения, например, лейкозы, лимфомы, миелома и другие злокачественные нарушения клеток плазмы, и метастатические опухоли. Преобладающие злокачественные опухоли включают в себя: рак молочной железы, рак предстательной железы, рак толстой кишки, рак легких, рак печени и рак поджелудочной железы. Лечение с помощью соединения может происходить в количестве, эффективном для улучшения по меньшей мере одного симптома неопластического нарушения, например сниженной клеточной пролиферации, сниженной массы опухоли и т.д.

Раскрытые способы применимы в профилактике и лечении злокачественной опухоли, включая в себя, например, солидные опухоли, опухоли мягких тканей и их метастазы, а также в наследственных раковых синдромах, таких как синдром Ли-Фраумени, наследственные синдромы рака молочной железы/яичников (мутации BRCA1 или BRAC2) и другие. Раскрытые способы также применимы в лечении несолидных злокачественных опухолей. Иллюстративные солидные опухоли включают в себя злокачественные опухоли (например, саркомы, аденокарциномы и карциномы) различных систем органов, такие как злокачественные опухоли легких, молочной железы, лимфоидного, желудочно-кишечного тракта (например, толстой кишки) и мочеполового тракта (например, опухоли почек, уротелиальные или тестикулярные опухоли), глотки, предстательной железы и яичника. Иллюстративные аденокарциномы включают в себя рак ободочной и прямой кишки, почечно-клеточную карциному, рак печени, немелкоклеточную карциному легких и рак тонкого кишечника.

Иллюстративные злокачественные опухоли, описанные Национальным институтом рака, включают в себя следующее: острый лимфобластный лейкоз у взрослых; острый лимфобластный лейкоз у детей; острый миелоидный лейкоз у взрослых; аденокарцинома; аденокарцинома у детей; связанная со СПИД лимфома; связанные со СПИД злокачественные опухоли; рак анального отверстия; астроцитомы, детская мозжечковая; астроцитомы, детская церебральная; рак желчных протоков, внепеченочный; рак мочевого пузыря; рак мочевого пузыря у детей; рак костей, остеосаркома/злокачественная фиброзная гистиоцитома; глиома ствола головного мозга у детей; опухоль головного мозга у взрослых; опухоль головного мозга, глиома ствола головного мозга у детей; опухоль головного мозга, мозжечковая астроцитомы у детей; опухоль головного мозга, церебральная астроцитомы/злокачественная глиома у детей; опухоль головного мозга, эпендимомы у детей; опухоль головного мозга, медуллобластома у детей; опухоль головного мозга, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли у детей; опухоль головного мозга, глиома зрительного пути и гипоталамическая глиома у детей; опухоль головного мозга у детей (другие); рак молочной железы; рак молочной железы и беременность; рак молочной железы у детей; рак молочной железы у мужчин; бронхиальные аденомы/карциномы у детей; карциноидная опухоль у детей; карциноидная опухоль желудочно-кишечного тракта; карцинома аденокарциномы; карцинома островковых клеток; карцинома неизвестной первичной локализации; лимфома центральной нервной системы, первичная; мозжечковая астроцитомы у детей; церебральная астроцитомы/злокачественная глиома у детей; рак шейки матки; злокачественные опухоли у детей; хронический лимфоцитарный лейкоз; хронический миелогенный лейкоз; хронические миело-пролиферативные нарушения; светлоклеточная саркома сухожильных влагалищ; рак толстой кишки; рак ободочной и прямой кишки у детей; кожная Т-клеточная лимфома; рак эндометрия; эпендимомы у детей; эпителиальный рак яичников; рак пищевода; рак пищевода у детей; опухоли семейства Юинга; экстракраниальная эмбрионально-клеточная опухоль у детей; внегонадная эмбрионально-клеточная опухоль; рак внепеченочных желчных протоков; рак глаза, внутриглазная меланома; рак глаза, ретинобластома; рак желчного пузыря; рак желудка; рак желудка у детей; карциноидная опухоль желудочно-кишечного тракта; эмбрионально-клеточная опухоль экстракраниальная у детей; эмбрионально-клеточная опухоль внегонадная; эмбрионально-клеточная опухоль яичников; гестационная трофобластическая опухоль; глиома ствола головного мозга у детей; глиома у детей зрительного пути и гипоталамическая; волосатоклеточный лейкоз; рак головы и шеи; гепатоцеллюлярный рак (печени) у взрослых (первичный); гепатоцеллюлярный рак (печени) у детей (первичный); ходжкинская лимфома у взрослых; ходжкинская лимфома у детей; ходжкинская лимфома во время беременности; подглоточный рак; гипоталамическая глиома и глиома зрительного пути у детей; внутриглазная меланома; карцинома островковых клеток (эндокринная часть поджелудочной железы); саркома Капоши; рак почки; рак гортани; рак гортани у детей; лейкоз, острый лимфобластный у взрослых; лейкоз, острый лимфобластный у детей; лейкоз острый миелоидный у взрослых; лейкоз острый миелоидный у детей; лейкоз хронический лимфоцитарный; лейкоз хронический миелогенный; лейкоз, волосатоклеточный; рак губы и ротовой полости; рак печени у взрослых (первичный); рак печени у детей (первичный); рак легких немелкоклеточный; рак легких мелкоклеточный; лимфобластный лейкоз у взрослых острый; лимфобластный лейкоз у детей острый; лимфоцитарный лейкоз хронический; лимфома, связанная со СПИД; лимфома, лимфома центральной нервной системы (первичная); кожная Т-клеточная; лимфома ходжкинская у взрослых; лимфома ходжкинская у детей; лимфома ходжкинская во время беременности; лимфома неходжкинская у взрослых; лимфома не

ходжкинская, у детей; лимфома неходжкинская во время беременности; лимфома центральной нервной системы первичная; макроглобулинемия, Вальденстрема; рак молочной железы у мужчин; злокачественная мезотелиома у взрослых; злокачественная мезотелиома у детей; злокачественная тимома; медуллобластома у детей; меланома; меланома, внутриглазная; карцинома из клеток Меркеля; мезотелиома злокачественная; метастатический плоскоклеточный рак со скрытой первичной локализацией; синдром множественных эндокринных неоплазий у детей; множественная миелома/плазмоцитомы; фунгоидный миелоз; миелодиспластические синдромы; миелогенный лейкоз хронический; миелоидный лейкоз у детей острый; миелома множественная; миелолипролиферативные нарушения хронические; рак носовой полости и придаточных пазух носа; рак носоглотки; рак носоглотки у детей; нейробластома; неходжкинская лимфома у взрослых; неходжкинская лимфома у детей; неходжкинская лимфома во время беременности; немелкоклеточный рак легких; рак ротовой полости у детей; рак ротовой полости и губы; рак ротоглотки; остеосаркома/злокачественная фиброзная гистиоцитома кости; рак яичников у детей; эпителиальный рак яичников; эмбрионально-клеточная опухоль яичников; пограничная опухоль яичников; рак поджелудочной железы; рак поджелудочной железы у детей; рак поджелудочной железы, островковых клеток; рак придаточных пазух носа и носовой полости; рак паращитовидной железы; рак полового члена; феохромоцитомы; пинеальные и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли у детей; опухоль гипофиза; плазмоцитомы/множественная миелома; плевроролечная бластома; беременность и рак молочной железы; беременность и ходжкинская лимфома; беременность и неходжкинская лимфома; первичная лимфома центральной нервной системы; первичный рак печени у взрослых; первичный рак печени у детей; рак предстательной железы; рак прямой кишки; почечно-клеточный рак (рак почки); почечно-клеточный рак у детей; переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника; ретинобластома; рабдомиосаркома у детей; рак слюнной железы; рак слюнной железы у детей; саркома, опухоли семейства Юинга; саркома, Капоши; саркома (остеосаркома)/злокачественная фиброзная гистиоцитома кости; саркома, рабдомиосаркома у детей; саркома мягких тканей у взрослых; саркома мягких тканей у детей; синдром Сезари; рак кожи; рак кожи у детей; рак кожи (меланома); карцинома кожи, клеток Меркеля; мелкоклеточный рак легких; рак тонкого кишечника; саркома мягких тканей у взрослых; саркома мягких тканей у детей; плоскоклеточный рак со скрытой первичной локализацией, метастатический; рак желудка; рак желудка у детей; супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли у детей; Т-клеточная лимфома кожная; рак яичка; тимома у детей; тимома злокачественная; рак щитовидной железы; рак щитовидной железы у детей; переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника; трофобластическая опухоль гестационная; рак с неизвестной первичной локализацией у детей; необычные злокачественные опухоли у детей; переходно-клеточный рак мочеточника и почечной лоханки; рак мочеиспускательного канала; саркома матки; рак вагины; глиома зрительного пути и гипоталамическая глиома у детей; рак вульвы; макроглобулинемия Вальденстрема и опухоль Вильмса.

Дополнительные иллюстративные злокачественные опухоли включают в себя диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL) и лимфому из клеток мантийной зоны (MCL).

Метастазы вышеупомянутых злокачественных опухолей также можно лечить или предотвратить согласно описанным в настоящем документе способам.

Комбинированные виды терапии.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе соединение вводят вместе с дополнительным "вторым" терапевтическим средством или видом лечения. Выбор второго терапевтического средства может быть сделан из любого средства, которое, как правило, используют в монотерапии для лечения определенного заболевания или состояния. Используемый в настоящем документе термин "вводимое совместно" и родственные термины относятся к одновременному или последовательному введению терапевтических средств согласно настоящему изобретению. Например, соединение согласно настоящему изобретению может быть введено с другим терапевтическим средством одновременно или последовательно в отдельных единичных лекарственных формах или вместе в одной единичной лекарственной форме. Соответственно, настоящее изобретение включает отдельную единичную лекарственную форму, содержащую соединение формулы I, дополнительное терапевтическое средство и фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или инертный носитель.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения если второе терапевтическое средство вводят субъекту, эффективное количество соединения согласно настоящему изобретению меньше, чем составляло бы его эффективное количество, если бы второе терапевтическое средство не вводили. Согласно другому варианту осуществления эффективное количество второго терапевтического средства меньше, чем составляло бы его эффективное количество, если бы соединение согласно настоящему изобретению не вводили. Таким образом, нежелательные побочные эффекты, связанные с высокими дозами любого средства, могут быть минимизированы. Другие потенциальные преимущества (включая в себя без ограничения улучшенные режимы дозирования и/или сниженную стоимость лекарственных средств) будут очевидными специалистам в настоящей области техники. Дополнительные средства могут быть введены отдельно, как часть режима введения многократных доз, от соединений согласно настоящему изобретению. Альтернативно, указанные средства могут быть частью отдельной лекарственной формы, смешанной вместе с соединениями согласно настоящему изобретению в отдельной композиции.

Противораковые виды комбинированной терапии.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе соединение вводят совместно с дополнительным противораковым лечением. Иллюстративные дополнительные виды противоракового лечения включают в себя, например, химиотерапию, таргетные виды терапии, такие как виды терапии антителами, ингибиторы киназы, иммунотерапия и гормональная терапия, эпигенетическая терапия, ингибиторы протеасомы и антиангиогенные виды терапии. Примеры каждого из указанных видов лечения предусмотрены ниже. Используемый в настоящем документе термин "комбинация", "комбинированный" и родственные термины относятся к одновременному или последовательному введению терапевтических средств согласно настоящему изобретению. Например, соединение согласно настоящему изобретению может быть введено с другим терапевтическим средством одновременно или последовательно в отдельных единичных лекарственных формах или вместе в одной единичной лекарственной форме. Соответственно, настоящее изобретение включает отдельную единичную лекарственную форму, содержащую соединение согласно настоящему изобретению, дополнительное терапевтическое средство и фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или инертный носитель.

Количество как соединения согласно настоящему изобретению, так и дополнительного терапевтического средства (в тех композициях, которые содержат дополнительное терапевтическое средство, описанное выше), которое можно комбинировать с материалами-носителями для получения отдельной лекарственной формы, будет варьировать в зависимости от подлежащего лечению хозяина и конкретного пути введения. Предпочтительно композиции согласно настоящему изобретению должны быть составлены так, чтобы могла быть введена дозировка, составляющая 0,01-100 мг/кг массы тела/день соединения согласно настоящему изобретению.

Химиотерапия.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе соединение вводят вместе с химиотерапией. Химиотерапия представляет собой лечение злокачественной опухоли с помощью лекарственных средств, которые могут разрушать злокачественные клетки. "Химиотерапия", как правило, относится к цитотоксическим лекарственным средствам, которые воздействуют на быстроделющиеся клетки в общем, в отличие от таргетной терапии. Химиотерапевтические лекарственные средства препятствуют делению клеток различными возможными путями, например, с помощью дупликации ДНК или разделения вновь образованных хромосом. Большинство форм химиотерапии нацелены на все быстроделющиеся клетки и не являются специфическими для злокачественных клеток, хотя некоторая степень специфичности может быть результатом неспособности многих злокачественных клеток к репарации повреждения ДНК, тогда как нормальные клетки, как правило, способны это осуществлять.

Примеры химиотерапевтических средств, используемых в противораковой терапии, включают в себя, например, антиметаболиты (например, фолиевая кислота, производные пурина и пиримидина) и алкилирующие средства (например, хлорметины, нитрозомочевины, платина, алкилсульфонаты, гидразины, триазины, азиридины, веретенный яд, цитотоксические средства, ингибиторы топоизомеразы и другие). Иллюстративные средства включают в себя следующее: акларубицин, актиномицин, алитретионин, алтретамин, аминоптерин, аминоклевулиновая кислота, амрубицин, амсакрин, анагрелид, триоксид мышьяка, аспарагиназа, атрасентан, белотекан, бексаротен, бендамустин, блеомицин, бортезомиб, бусульфид, камптотецин, капецитабин, карбоплатин, карбоксон, кармофур, кармусти, цеlexоксид, хлорамбуцил, хлорметин, цисплатин, кладрибин, клофарабин, кризантаспаза, циклофосфамид, цитарабин, дакарбазин, дактиномицин, даунорубицин, децитабин, демеколцин, доцетаксел, доксорубицин, эфапроксирал, элескломол, элсамитруцин, эноцитабин, эпирубицин, эстрамусти, этоглуцид, этопозид, флоксуридин, флударабин, фторурацил (5fu), фотемустин, гемцитабин, имплантаты Gliadel, гидроксикарбамид, гидроксимочевина, идарубицин, ифосфамид, иринотекан, ирофулвен, иксабепилон, ларотаксел, лейковорин, липосомный доксорубицин, липосомный даунорубицин, лонидамин, ломустин, лукантон, манносальфан, мазопрокол, мелфалан, меркаптопурин, месна, метотрексат, метиламиноклевулилат, митобронитол, митогуазон, митотан, митомицин, митоксантрон, недаплатин, нимустин, облимерсен, омацетаксин, ортатаксел, оксалиплатин, паклитаксел, пегаспаргаза, пеметрексед, пентостатин, пирарубицин, пиксантрон, пликамицин, порфирин натрия, преднимустин, прокарбазин, ралтитрексед, ранимустин, рубитекан, сапатинабин, семустин, ситимаген цераденовек, стратаплатин, стрептозоцин, талапорфин, тегафер-урацил, темопорфин, темозоломид, тенипозид, тесетаксел, тестолактон, тетранитрат, тиотепа, тиазофуридин, тиогуанин, типифарниб, топотекан, трабектедин, триазиквон, триэтиленмеламин, триплатин, третиноин, трео-сульфан, трофосфамид, урамустин, вальрубицин, вертепорфин, винбластин, винкристин, виндезин, винфлунидин, винорелбин, вориностат, зорубицин и другие цитостатические или цитотоксические средства, описанные в настоящем документе.

Поскольку некоторые лекарственные средства работают лучше вместе, чем отдельно, два или несколько лекарственных средств зачастую вводят в одно и то же время. Часто два или несколько химиотерапевтических средств используют в качестве комбинированной химиотерапии. Согласно некоторым вариантам осуществления химиотерапевтические средства (включая в себя комбинированную химиотерапию) можно использовать в комбинации с описанным в настоящем документе соединением.

Таргетная терапия.

Таргетная терапия представляет собой применение средств, специфических для дерегулированных белков злокачественных клеток. Низкомолекулярные лекарственные средства таргетной терапии, как правило, представляют собой ингибиторы ферментных доменов на мутированных, избыточно экспрессированных или иным образом критически измененных белков внутри злокачественной клетки. Яркими примерами являются такие ингибиторы тирозинкиназы, как акситиниб, босутиниб, цедираниб, дезатиниб, эролотиниб, иматиниб, гефитиниб, лапатиниб, лестауртиниб, нилотиниб, семаксаниб, сорафениб, сунпитиниб и вандетаниб, а также такие ингибиторы циклинзависимой киназы, как альвоцидид и селициклиб. Терапия моноклональными антителами представляет собой другую стратегию, в которой терапевтическое средство представляет собой антитело, которое специфически связывается с белком на поверхности злокачественных клеток. Примеры включают в себя антитело к HER2/neu трастузумаб (Herceptin®), типично используемый при раке молочной железы, и антитело к CD20 ритуксимаб и тозитуломаб, типично используемое при разнообразных В-клеточных злокачественных опухолях. Другие иллюстративные антитела включают в себя цетуксимаб, панитумумаб, трастузумаб, алемтузумаб, бевацизумаб, эдrekоломаб и гемтузумаб. Иллюстративные слитые белки включают в себя афлиберцепт и денилейкин дифтитокс. Согласно некоторым вариантам осуществления таргетная терапия может использоваться в комбинации с описанным в настоящем документе соединением, например глибек (Vignani and Wang, 2001).

Таргетная терапия также может включать небольшие пептиды в качестве "устройства самонаведения", которые могут связываться с рецепторами клеточной поверхности или воздействовать на внеклеточный матрикс, окружающий опухоль. Радионуклиды, которые прикреплены к таким пептидам (например, RGD), в конце концов уничтожают злокачественную клетку, если нуклид распадается вблизи клетки. Пример такой терапии включает в себя BEXXAR®.

Ангиогенез.

Описанные в настоящем документе соединения и способы можно использовать для лечения или профилактики заболевания или нарушения, связанного с ангиогенезом. Заболевания, связанные с ангиогенезом, включают в себя злокачественную опухоль, сердечно-сосудистое заболевание и макулярную дегенерацию.

Ангиогенез представляет собой физиологический процесс, включающий в себя рост новых кровеносных сосудов из уже существующих сосудов. Ангиогенез представляет собой нормальный и жизнеобеспечивающий процесс в росте и развитии, а также в заживлении ран и в грануляции ткани. Тем не менее, также он представляет собой фундаментальную стадию в переходе опухолей из состояния покоя в злокачественное состояние. Ангиогенез может представлять собой мишень для борьбы с заболеваниями, характеризующимися слабой васкуляризацией или аномальной сосудистой сетью.

Применение конкретных соединений, которые могут ингибировать или индуцировать создание новых кровеносных сосудов в организме, может помочь в борьбе с такими заболеваниями. Присутствие кровеносных сосудов там, где их вообще не должно быть, может оказывать воздействие на механические свойства ткани, повышая вероятность нарушения. Отсутствие кровеносных сосудов в восстанавливающейся ткани или иным образом метаболически активной ткани может ингибировать заживление или другие необходимые функции. Некоторые заболевания, такие как ишемические хронические раны, являются результатом отсутствия или недостаточного формирования кровеносных сосудов, и их можно лечить путем локального распространения кровеносных сосудов, таким образом, принося новые питательные вещества к указанному месту, облегчая восстановление. Другие заболевания, такие как возрастная макулярная дегенерация, могут быть созданы путем локального распространения кровеносных сосудов, препятствуя нормальным физиологическим процессам.

Было продемонстрировано, что фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) вносит основной вклад в ангиогенез, увеличивая число капилляров в данной сети. Положительная регуляция VEGF представляет собой основной компонент физиологического ответа на нагрузку, и предполагают, что его роль в ангиогенезе представляет собой возможное лечение повреждений сосудов. Исследования *in vitro* ясно демонстрируют, что VEGF представляет собой сильный стимулятор ангиогенеза, поскольку в присутствии указанного фактора роста помещенные на планшет эндотелиальные клетки будут пролиферировать и мигрировать, в конце концов формируя трубчатые структуры, напоминающие капилляры.

Опухоли индуцируют рост сосудов (ангиогенез) путем секреции различных факторов роста (например, VEGF). Такие факторы роста, как bFGF и VEGF, могут индуцировать рост капилляров в опухоль, что, как предполагают некоторые исследователи, предоставляет необходимые питательные вещества, позволяя опухоли распространяться.

Ангиогенез представляет собой превосходную терапевтическую мишень для лечения сердечно-сосудистого заболевания. Он представляет собой активный физиологический процесс, который лежит в основе естественного способа, с помощью которого наши организмы отвечают на сокращение кровоснабжения к жизненноважным органам, а именно созданию новых коллатеральных сосудов для преодоления ишемического инсульта.

Избыточная экспрессия VEGF вызывает повышенную проницаемость в кровеносных сосудах в дополнение к стимуляции ангиогенеза. При влажной макулярной дегенерации VEGF вызывает пролиферацию капилляров в сетчатке. Поскольку увеличение ангиогенеза также вызывает отек, кровь и другие жидкости сетчатки просачиваются в сетчатку, вызывая потерю зрения.

Антиангиогенная терапия может включать в себя ингибиторы киназы, нацеленно воздействующие на фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), такие как сунитиниб, сорафениб, или моноклональные антитела или рецепторные "ловушки" для VEGF или рецептора VEGF, включая в себя бевацизумаб или VEGF-Trap, или талидомид или его аналоги (леналидомид, помалидомид), или средства, нацеленно воздействующие на не относящиеся к VEGF ангиогенные мишени, такие как фактор роста фибробластов (FGF), ангиопоэтины или ангиостатин или эндостатин.

Эпигенетика.

Описанные в настоящем документе соединения и способы можно использовать для лечения или профилактики заболевания или нарушения, связанного с эпигенетикой. Эпигенетика представляет собой изучение наследственных изменений в фенотипе или генной экспрессии, вызванных механизмами, отличными от изменений в последовательности ДНК, лежащей в их основе. Один пример эпигенетических изменений в биологии эукариот представляет собой процесс клеточной дифференциации. В ходе морфогенеза стволовые клетки становятся различными клеточными линиями эмбриона, которые в свою очередь становятся полностью дифференцированными клетками. Другими словами, одна оплодотворенная яйцеклетка изменяется во многие типы клеток, включая в себя нейроны, мышечные клетки, эпителий, кровеносные сосуды и т.д., поскольку она продолжает делиться. Это происходит именно так путем активации некоторых генов наряду с ингибированием других.

Эпигенетические изменения сохраняются, когда клетки поделились. Большинство эпигенетических изменений существуют только в пределах продолжительности жизни одного отдельного организма, однако если мутация в ДНК была вызвана в сперматозоиде или яйцеклетке, что привело к оплодотворению, то некоторые эпигенетические изменения наследуются от одного поколения следующим поколением. Конкретные эпигенетические процессы включают в себя парамутацию, генетический букмаркинг, импринтинг, сайленсинг генов, инактивацию X хромосомы, эффект положения, репрограммирование, трансекцию, материнские эффекты, развитие карциногенеза, многие эффекты тератогенов, регуляцию модификаций гистонов и гетерохроматина и технические ограничения, оказывающие воздействия на партеногенез и клонирование.

Иллюстративные заболевания, связанные с эпигенетикой, включают в себя ATR-синдром, синдром ломкой X-хромосомы, синдром ICF, синдром Энгельмана, синдром Прадера-Вилли, BWS, синдром Ретта, α -талассемию, злокачественную опухоль, лейкоз, синдром Рубинштейна-Тейби и синдром Коффина-Лоури.

Первое заболевание человека, которое связали с эпигенетикой, была злокачественная опухоль. Исследователи обнаружили, что пораженная заболеванием ткань от пациентов с раком ободочной и прямой кишки характеризовалась меньшей степенью метилирования ДНК, чем нормальная ткань от тех же пациентов. Поскольку метилированные гены, как правило, выключаются, потеря метилирования ДНК может вызвать аномально высокую активацию генов путем изменения аранжировки хроматина. С другой стороны, слишком высокая степень метилирования может отменить работу протекторных генов-супрессоров опухолевого роста.

Метилирование ДНК происходит на сайтах CpG и большинство цитозинов CpG метилируются у млекопитающих. Тем не менее, существуют удлинения ДНК вблизи промоторных областей, которые содержат повышенные концентрации сайтов CpG (известных как островки CpG), которые не содержат метилирование в нормальных клетках. Указанные островки CpG становятся избыточно метилированными в злокачественных клетках, тем самым вызывая выключение генов, которые не должны быть подвергнуты сайленсингу. Указанная аномалия представляет собой характерное эпигенетическое изменение, которое имеет место в опухолях и происходит на ранних стадиях развития злокачественной опухоли. Гиперметилирование островков CpG может вызвать опухоли путем выключения генов-супрессоров опухолевого роста. В действительности, указанные типы изменений могут быть более распространены в злокачественной опухоли человека, чем мутации последовательностей ДНК.

Более того, хотя эпигенетические изменения не изменяют последовательность ДНК, они могут вызывать мутации. Приблизительно половина генов, которые вызывают семейные или наследственные формы злокачественной опухоли, выключаются метилированием. Большинство указанных генов в норме подавляют формирование опухоли и помогают репарировать ДНК, включая в себя Об-метилгуанин-ДНК метилтрансферазу (MGMT), ингибитор 2B циклинзависимой киназы MLH1 (CDKN2B) и RASSF1A. Например, гиперметилирование промотора MGMT вызывает ряд возрастных мутаций G в A.

Гиперметилирование также может приводить к нестабильности микросателлитов, которые представляют собой повторяющиеся последовательности ДНК. Микросателлиты являются распространенными у нормальных особей, и они, как правило, состоят из повторов динуклеотида CA. Слишком высокая степень метилирования промотора гена репарации ДНК MLH1 может делать микросателлит нестабильным и удлинять или укорачивать его. Нестабильность микросателлита была связана со многими злокаче-

ственными опухолями, включая в себя рак ободочной и прямой кишки, рак эндометрия, рак яичников и рак желудка.

Синдром ломкой X хромосомы представляет собой наиболее частую наследственную причину задержки умственного развития, особенно у мужчин. Оба пола могут поражаться указанным состоянием, но поскольку мужчины содержат только одну X хромосому, одна ломкая X будет оказывать на них более тяжелое воздействие. В действительности, синдром ломкой X хромосомы встречается приблизительно у 1 из 4000 мужчин и у 1 из 8000 женщин. Люди с указанным синдромом характеризуются тяжелой умственной отсталостью, задержкой развития речи и подобным "аутистическому" поведением.

Синдром ломкой X хромосомы получил свое название на основании вида части X хромосомы, которая содержит генную аномалию, под микроскопом; она, как правило, выглядит так, будто она подвешена за нитку и легко ломается. Синдром вызывается аномалией в гене FMR1 (умственная отсталость при ломкой X хромосоме 1). Люди, у которых отсутствует синдром ломкой X хромосомы, содержат 6-50 повторов тринуклеотида CGG в своем гене FMR1. Тем не менее, лица с больше чем 200 повторами содержат полную мутацию, и они, как правило, демонстрируют симптомы синдрома. Слишком много CGG вызывают то, что островки CpG на промоторной области гена FMR1 становятся метилированными; в норме, они такими не являются. Это метилирование выключает ген, останавливая продукцию геном FMR1 важного белка, называемого белок умственной отсталости при ломкой X хромосоме. Потеря указанного специфического белка вызывает синдром ломкой X хромосомы. Хотя было посвящено много внимания мутации экспансии CGG в качестве причины ломкой X хромосомы, эпигенетическое изменение, связанное с метилированием FMR1, представляет собой действительную причину синдрома.

Синдром ломкой X хромосомы не является единственным нарушением, связанным с умственной отсталостью, которое включает в себя эпигенетические изменения. Другие такие состояния включают в себя синдромы Рубинштейна-Тейби, Коффина-Лоури, Прадера-Вилли, Энгельмана, Беквита-Видеманна, ATR-X и синдром Ретта.

Эпигенетические виды терапии включают в себя ингибиторы ферментов, контролирующих эпигенетические модификации, в частности ДНК-метилтрансферазы и гистондеацетилазы, которые продемонстрировали перспективные противоопухолевые эффекты для некоторых злокачественных опухолей, а также антисмысловые олигонуклеотиды и миРНК.

Иммунотерапия.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе соединение вводят вместе с иммунотерапией. Иммунотерапия злокачественных опухолей относится к многообразному набору терапевтических стратегий, разработанных для индукции собственной иммунной системы пациента для борьбы с опухолью. Современные способы стимуляции иммунного ответа против опухолей включают в себя внутрипузырную BCG иммунотерапию для поверхностного рака мочевого пузыря, вакцины против рака предстательной железы Provenge и применение интерферонов и других цитокинов для индукции иммунного ответа у пациентов с почечно-клеточной карциномой и меланомой.

Трансплантация аллогенных гематопозитических стволовых клеток может рассматриваться в качестве формы иммунотерапии, поскольку иммунные клетки донора зачастую будут атаковать опухоль в реакции трансплантат-против-опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления иммунотерапевтические средства можно использовать в комбинации с описанным в настоящем документе соединением.

Гормональная терапия.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе соединение вводят с гормональной терапией. Рост некоторых злокачественных опухолей можно ингибировать путем обеспечения или блокирования определенных гормонов. Типичные примеры гормон-чувствительных опухолей включают в себя определенные типы рака молочной железы и предстательной железы, а также определенные типы лейкоза, которые отвечают на определенные ретиноиды/ретиновые кислоты. Удаление или блокирование эстрогена или тестостерона зачастую представляет собой важное дополнительное лечение. При определенных злокачественных опухолях введение таких агонистов гормонов, как прогестогены, может являться терапевтически эффективным. Согласно некоторым вариантам осуществления средства гормональной терапии можно использовать в комбинации с описанным в настоящем документе соединением.

Средства гормональной терапии включают в себя введение агонистов гормонов или антагонистов гормонов и включают в себя ретиноиды/ретиновую кислоту, соединения, которые ингибируют эстроген или тестостерон, а также введение прогестогенов.

Воспаление и аутоиммунное заболевание.

Описанные в настоящем документе соединения и способы можно использовать для лечения или профилактики заболевания или нарушения, связанного с воспалением, в частности, у людей и других млекопитающих. Описанное в настоящем документе соединение можно вводить перед появлением, во время или после начала воспаления. В случае профилактического применения соединения предпочтительно включать до появления какого-либо воспалительного ответа или симптома. Введение соединений может предотвратить или ослабить воспалительные ответы или симптомы. Иллюстративные воспалительные состояния включают в себя, например, следующее: рассеянный склероз, ревматоидный артрит,

псориаз, псориатический артрит, дегенеративное заболевание сустава, спондилоартропатии, другие серонегативные воспалительные артриты, ревматическая полимиалгия, различные васкулиты (например, гигантоклеточный артериит, ANCA+ васкулит), подагрический артрит, системная красная волчанка, ювенильный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, остеоартрит, остеопороз, диабет (например, инсулинозависимый сахарный диабет или ювенильный диабет), менструальные боли, кистозный фиброз, воспалительное заболевание кишечника, синдром раздраженного кишечника, болезнь Крона, слизистый колит, язвенный колит, гастрит, эзофагит, панкреатит, перитонит, болезнь Альцгеймера, шок, анкилозирующий спондилит, гастрит, конъюнктивит, панкреатит (острый или хронический), синдром полиорганной недостаточности (например, вторичный по отношению к септицемии или травмы), инфаркт миокарда, атеросклероз, апоплексический удар, реперфузионное повреждение (например, вследствие сердечно-легочного шунтирования или почечного диализа), острый гломерулонефрит, термическое повреждение (т.е. солнечный ожог), некротизирующий энтероколит, связанный с переливанием гранулоцитов синдром и/или синдром Шегрена. Иллюстративные воспалительные состояния кожи включают в себя, например, экзему, атопический дерматит, контактный дерматит, крапивницу, склеродермию, псориаз и дерматоз с острыми воспалительными компонентами.

Согласно другому варианту осуществления описанное в настоящем документе соединение или способ можно использовать для лечения или профилактики аллергий и респираторных состояний, включая в себя бронхиальную астму, бронхит, фиброз легких, аллергический ринит, кислородную токсичность, эмфизему, хронический бронхит, синдром острой дыхательной недостаточности и любое хроническое обструктивное заболевание легких (COPD). Соединения можно использовать для лечения инфекции хронического гепатита, включая в себя гепатит В и гепатит С.

Кроме того, описанное в настоящем документе соединение или способ можно использовать для лечения аутоиммунных заболеваний и/или воспаления, связанного с аутоиммунными заболеваниями, такими как органно-тканевые аутоиммунные заболевания (например, синдром Рейно), склеродермия, тяжелая миастения, отторжение трансплантата, эндотоксический шок, сепсис, псориаз, экзема, дерматит, рассеянный склероз, аутоиммунный тиреоидит, увеит, системная красная волчанка, болезнь Аддисона, аутоиммунное полигландулярное заболевание (также известное как аутоиммунный полигландулярный синдром) и диффузный токсический зоб.

Согласно конкретному варианту осуществления описанные в настоящем документе соединения можно использовать для лечения рассеянного склероза. Согласно конкретному аспекту соединения, используемое для лечения рассеянного склероза, представляет собой соединение 1 (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-1-(3,3-дифторазетидин-1-ил)проп-2-ен-1-он).

Комбинированная терапия.

Согласно определенным вариантам осуществления описанное в настоящем документе соединение может быть введено отдельно или в комбинации с другими соединениями, применимыми для лечения или профилактики воспаления. Иллюстративные противовоспалительные средства включают в себя, например, стероиды (например, кортизол, кортизон, флудкортизон, преднизон, 6 α -метилпреднизон, триамцинолон, бетаметазон или дексаметазон), нестероидные противовоспалительные лекарственные средства НПВС (например, аспирин, ацетаминофен, толметин, ибупрофен, мефенаминовая кислота, пироксикам, набуметон, рофекоксиб, целекоксиб, этодолак или нимесулид). Согласно другому варианту осуществления другое терапевтическое средство представляет собой антибиотик (например, ванкомицин, пенициллин, амоксициллин, ампициллин, цефотаксим, цефтриаксон, цефиксим, рифампинметронидазол, доксициклин или стрептомицин). Согласно другому варианту осуществления другое терапевтическое средство представляет собой ингибитор PDE4 (например, рофлумиласт или ролипрам). Согласно другому варианту осуществления другое терапевтическое средство представляет собой антигистамин (например, циклизин, гидроксизин, прометазин или дифенгидрамин). Согласно другому варианту осуществления другое терапевтическое средство представляет собой противомалярийное средство (например, артемизинин, артемизинин, артеметер, артеметер, хлорохин фосфат, мефлохин гидрохлорид, доксициклин гиклат, прогуанил гидрохлорид, атоваквон или галофантрин). Согласно одному варианту осуществления другое соединение представляет собой дротрекгоин α .

Дополнительные примеры противовоспалительные средства включают в себя, например, ацеклофенак, ацетамин, ϵ -ацетидамокапроновую кислоту, ацетаминофен, ацетаминозалол, ацетанилид, ацетилсалициловую кислоту, S-аденозилметионин, алклофенак, алклометазон, алфентанил, альгестон, аллилпродин, альминопрофен, алоксиприн, альфапродин, бис(ацетилсалицилат) алюминия, амцинодин, амфенак, аминохлортоноксазин, 3-амино-4-гидроксимасляную кислоту, 2-амино-4-пиколлин, аминопропилон, аминопирин, амиксетрин, салицилат аммония, ампиноксикам, амтолметин гуацил, анилеридин, антипирин, антрафенин, апазон, беклометазон, бендазак, бенорилат, беноксапрофен, бензпиперилон, бензидамин, бензилморфин, бермопрофен, бетаметазон, бетаметазон-17-валерат, безитрамид, α -бисаболол, бромфенак, п-бромасетанилид, ацетат 5-бромсалициловой кислоты, бромосалигенин, буцетин, буклоксовую кислоту, буколом, будесонид, буфексмак, бумадизон, бупренорфин, бутацетин, бутибуфен, буторфанол, карбамазепин, карбифен, карпрофен, карсалам, хлорбутанол, хлорпреднизон, хлортоноксазин,

холин салицилат, цинхофен, цинметацин, цирамадол, клиданак, клобетазол, клокортолон, клонитазен, клониксин, клопирак, клопреднол, клов, кодеин, кодеин метилбромид, кодеин фосфат, кодеин сульфат, кортизон, кортивазол, кропропамид, кротетамид, циклазоцин, дефлазакорт, дегидротестостерон, дезоморфин, дезонид, дезоксиметазон, дексаметазон, дексаметазон-21-изоникотинат, дексоксадол, декстроморамид, декстропропоксифен, дезоксикортикостерон, дезоцин, диампромид, диаморфон, диклофенак, дифенамизол, дифенпирамид, дифлоразон, дифлукортолон, дифлунизал, дифлупреднат, дигидрокодеин, дигидрокодеинон енолацетат, дигидроморфин, ацетилсалицилат дигидроксиалюминия, дименоксадол, димефептанол, диметилтиамбутен, диоксафетил бутират, дипипанон, дипроцетил, дипирон, дитазол, дроксикам, эморфазон, энфенамовую кислоту, эноксолон, эпиризол, эптазоцин, этерзалат, этензамид, этогептазин, этоксазен, этилметилтиамбутен, этилморфин, этодолак, этофенамат, этонитазен, эугенол, фелбинак, фенбуфен, фенклозовую кислоту, фендозал, фенопрофен, фентанил, фентиазак, фепрадиол, фепразон, флоктафенин, флазакарт, флуклоронид, флуфенамовую кислоту, флуметазон, флунизол, флуниксин, флуноксапрофен, флуоцинолон ацетонид, флуоцинонид, флуоцинолон ацетонид, флуокортин бутил, флуокортолон, флуорезон, фторметолон, флуперолон, флупиртин, флупредниден, флупреднизолон, флупроквизон, флурандренолид, флурбипрофен, флутиказон, формокортал, фосфозал, гентизиновую кислоту, глафенин, глюкаметацин, гликоль салицилат, гвайазулен, галцинонид, галобетазол, галометазон, галопреднон, героин, гидрокодон, гидрокортамат, гидрокортизон, гидрокортизон ацетат, гидрокортизон сукцинат, гидрокортизон гемисукцинат, гидрокортизон 21-лизинат, гидрокортизон ципионат, гидроморфон, гидроксипетидин, ибуфенак, ибупрофен, ибупроксам, имидазол салицилат, индометацин, индопрофен, изофезолак, изофлупредон, изофлупредон ацетат, изоладол, изометадон, изониксин, изоксерак, изоксикам, кетобемидон, кетопрофен, кеторолак, паралактофенетид, лефетамин, леваллорфан, леворфанол, левофенацил-морфан, лопентанил, лоназолак, лорноксикам, локсопрофен, лизин ацетилсалицилат, мазипредон, меклофенамовую кислоту, медризон, мефенамовую кислоту, мелоксикам, меперидин, мепреднизон, мептазинол, мезаламин, метазоцин, метадон, метотримепразин, метилпреднизолон, метилпреднизолон ацетат, метилпреднизолон сукцинат натрия, метилпреднизолон сулептанат, метиазициновую кислоту, метофолин, метопон, мофебутазон, мофезолак, мометазон, моразон, морфин, морфин гидрохлорид, морфин сульфат, морфолин салицилат, мирофин, набуметон, налбуфин, налорфин, 1-нафтилсалицилат, напроксен, нарцеин, нефопам, никоморфин, нифеназон, нифлумовую кислоту, нимесулид, 5'-нитро-2'-пропоксиацетанилид, норлеворфанол, норметадон, норморфин, норпипанон, олсалазин, опиум, оксацепрол, оксаметацин, оксапрозин, оксикодон, оксиморфон, оксифенбутазон, пантопон, параметазон, паралилин, парсальмид, пентазоцин, перизоксал, фенацетин, фенадоксон, феназоцин, феназопиридин гидрохлорид, феноколл, фенотеридин, фенотеразон, фенотерфан, фенилацетилсалицилат, фенилбутазон, фенилсалицилат, фенираמידол, пикетопрофен, пиминодин, пипебузон, пиперилон, пирозолак, пиритрамид, пироксикам, пирпрофен, пранопрофен, предникарбат, преднизолон, преднизон, преднивал, преднидиден, проглуметацин, прогептазин, промедол, пропацетамол, проперицин, пропирам, пропоксифен, пропифеназон, проквизон, протизиновую кислоту, проксалол, рамифеназон, ремифентанил, метилсульфат римазолия, салацетамид, салицин, салициламид, салициламид орто-уксусной кислоты, салициловую кислоту, салицилсерную кислоту, салсалат, салверин, симетрид, суфентанил, сульфасалазин, сулиндик, супероксиддисмутаза, супрофен, суксизон, талнифлумат, тендап, теноксикам терофенамат, тетрадрин, тиазолинобутазон, тиапрофеновую кислоту, тиарамид, тилидин, тиноридин, тиксокортол, толфенамовую кислоту, толметин, трамадол, триамцинолон, триамцинолон ацетонид, тропезин, винимол, ксенбуцин, ксимопрофен, зальтопрофен и зомепирак.

Согласно одному варианту осуществления описанное в настоящем документе соединение может быть введено с селективным ингибитором COX-2 для лечения или профилактики воспаления. Иллюстративные селективные ингибиторы COX-2 включают в себя, например, деракоксиб, парекоксиб, целекоксиб, вальдекоксиб, рофекоксиб, эторикоксиб и лумиракоксиб.

Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренное соединение вводят в комбинации с антрациклином или ингибитором Торо II. Согласно определенным вариантам осуществления предусмотренное соединение вводят в комбинации с доксорубицином (Dox). Согласно определенным вариантам осуществления предусмотренное соединение вводят в комбинации с бортезомибом (и в более широком смысле включая в себя карфилзомиб). Неожиданно было обнаружено, что предусмотренное соединение в комбинации с Dox или бортезомибом приводило к синергическому эффекту (т.е. более чем аддитивному).

Вирусные инфекции.

Описанные в настоящем документе соединения и способы можно использовать для лечения или профилактики заболевания или нарушения, связанного с вирусной инфекцией, в частности, у людей и других млекопитающих. Описанное в настоящем документе соединение можно вводить перед появлением, во время или после начала вирусной инфекции. В случае профилактического применения соединения предпочтительно включают до появления какой-либо вирусной инфекции или ее симптома.

Иллюстративные вирусные заболевания включают в себя острый лихорадочный фарингит, фарингоконъюнктивит, эпидемический кератоконъюнктивит, детский гастроэнтерит, инфекции Коксаки, инфекционный мононуклеоз, лимфому Беркита, острый гепатит, хронический гепатит, цирроз печени, гепаток-

леточную карциному, первичную инфекцию HSV-1 (например, гингивостоматит у детей, тонзиллит и фарингит у взрослых, кератоконъюнктивит), латентную инфекцию HSV-1 (например, герпес губы и герпетические лихорадки), первичную инфекцию HSV-2, латентную инфекцию HSV-2, асептический менингит, инфекционный мононуклеоз, инклюзионную цитомегалию, саркому Капоши, многоочаговую болезнь Кастлемана, первичную эффузионную лимфому, СПИД, грипп, синдром Рейе, корь, постинфекционный энцефаломиелит, паротит, гиперпластические эпителиальные поражения (например, обыкновенные, плоские, подошвенные и аногенитальные бородавки, папилломы гортани, бородавчатая эпидермодисплазия), карциному шейки матки, плоскоклеточные карциномы, круп, воспаление легких, бронхолит, простуду, полиомиелит, бешенство, гриппоподобный синдром, тяжелый бронхолит с воспалением легких, коревую краснуху, врожденную краснуху, ветряную оспу и опоясывающий герпес.

Иллюстративные вирусные патогены включают в себя аденовирус, вирус Коксаки, вирус денге, вирус энцефалита, вирус Эпштейна-Барра, вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус простого герпеса 1 типа, вирус простого герпеса 2 типа, цитомегаловирус, вирус герпеса человека 8 типа, вирус иммунодефицита человека, вирус гриппа, вирус кори, вирус паротита, папилломавирус человека, вирус парагриппа, вирус полиомиелита, вирус бешенства, респираторно-синцитиальный вирус, вирус краснухи, вирус ветряной оспы, вирус лихорадки Западного Нила, вирус денге и вирус желтой лихорадки. Вирусные патогены также могут включать в себя вирусы, которые вызывают резистентные вирусные инфекции.

Противовирусные лекарственные средства представляют собой класс лекарственных препаратов, используемых специфически для лечения вирусных инфекций. Противовирусное действие, как правило, попадает в один из трех механизмов: препятствие способности вируса инфильтрировать целевую клетку (например, амантадин, римантадин и плеконарил), ингибирование синтеза вируса (например, аналоги нуклеозидов, например, ацикловир и зидовудин (AZT), и ингибирование высвобождения вируса (например, занамивир и осельтамивир).

Офтальмология.

Описанные в настоящем документе соединения и способы можно использовать для лечения или профилактики офтальмологического нарушения. Иллюстративные офтальмологические нарушения включают в себя макулярный отек (диабетический и недиабетический макулярный отек), возрастную макулярную дегенерацию, влажную и сухую формы, возрастную дисковидную макулярную дегенерацию, кистозный макулярный отек, пальпебральный отек, отек сетчатки, диабетическую ретинопатию, хориоретинопатию, неоваскулярную макулопатию, неоваскулярную глаукому, увеит, ирит, ретинальный васкулит, эндофтальмит, панеофтальмит, метастатическую офтальмию, хороидит, ретинальный пигментный эпителиит, конъюнктивит, циклит, склерит, эписклерит, неврит зрительного нерва, ретробульбарный неврит зрительного нерва, кератит, блефарит, экссудативное отслоение сетчатки, язву роговицы, язву конъюнктивы, хронический нуммулярный кератит, офтальмологическое заболевание, связанное с гипоксией или ишемией, ретинопатию недоношенных, пролиферативную диабетическую ретинопатию, полипообразную хориоидальную васкулопатию, ретинальную ангиоматозную пролиферацию, окклюзию ретинальных артерий, окклюзию ретинальных вен, болезнь Коутса, семейную экссудативную витреоретинопатию, болезнь отсутствия пульса (болезнь Такаюсу), болезнь Илза, синдром антифосфолипидных антител, лейкоэмическую ретинопатию, синдром повышенной вязкости крови, макроглобулинемию, интерферон-ассоциированную ретинопатию, гипертензивную ретинопатию, лучевую ретинопатию, дефицит стволовых эпителиальных клеток роговицы и катаракту.

Другие офтальмологические нарушения, поддающиеся лечению с применением описанных в настоящем документе соединений и способов, включают в себя пролиферативную витреоретинопатию и хроническое отслоение сетчатки.

Воспалительные заболевания глаз также поддаются лечению с применением описанных в настоящем документе соединений и способов.

Нейродегенеративное заболевание.

Нейродегенерация представляет собой широкий термин для прогрессирующей потери структуры или функции нейронов, включая в себя смерть нейронов. Многие нейродегенеративные заболевания, включая в себя болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и болезнь Хантингтона, появляются в результате нейродегенеративных процессов. В ходе исследований в этой области возникли многие сходства, которые связывают друг с другом указанные заболевания на субклеточном уровне. Обнаружение этих сходств дает надежду на терапевтические достижения, которые смогут облегчить несколько заболеваний одновременно. Существуют многочисленные параллели между различными нейродегенеративными нарушениями, включая в себя атипичную сборку белков, а также индуцированную клеточную смерть.

Болезнь Альцгеймера характеризуется потерей нейронов и синапсов в коре головного мозга и определенных субкортикальных областях. Эта потеря приводит к обширной атрофии пораженных областей, включая в себя дегенерацию в височной доле головного мозга и теменной доле головного мозга, и части фронтальной коры головного мозга и поясной извилины.

Болезнь Хантингтона вызывает астроглиоз и потерю срединных шипиковых нейронов. Области головного мозга поражаются в соответствии со своей структурой и типами нейронов, которые они со-

держат, снижаясь в размерах, поскольку они суммарно теряют клетки. Пораженные области, главным образом, находятся в полосатом теле, а также во фронтальной и височной коре головного мозга. Субталамические ядра полосатого тела посылают контролирующие сигналы на бледный шар, который иницирует и модулирует движение. Ослабленные сигналы от субталамических ядер, таким образом, вызывают сниженную инициацию и модуляцию движений, приводя к характерным для указанного нарушения движениям. Иллюстративные средства для лечения болезни Хантингтона включают в себя тетрабеназин, нейролептики, бензодиазепины, амантадин, ремацемид, вальпроевую кислоту, селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (SSRI), мirtазапин и антипсихотики.

Механизм, посредством которого утрачиваются клетки головного мозга при болезни Паркинсона, может состоять из аномального накопления белка α -синуклеина, связанного с убиквитином в поврежденных клетках. Комплекс α -синуклеина с убиквитином не может быть направлен на протеасому. Указанное накопление белка образует белковые цитоплазматические включения, называемые тельца Леви. Последнее исследование патогенеза заболевания показало, что смерть дофаминэргических нейронов под действием α -синуклеина опосредуется дефектом в механизме, который транспортирует белки между двумя основными клеточными органеллами - эндоплазматическим ретикулом (ER) и аппаратом Гольджи. Определенные белки, такие как Rab1, могут приводить к обратному развитию указанного дефекта, вызванного α -синуклеином, в животных моделях. Иллюстративные виды терапии болезни Паркинсона включают в себя леводопу, агонисты дофамина, такие как бромокриптин, перголид, промипексол, ропинирол, пирибедил, каберголин, ароморфин и лисурид, ингибиторы дофа-декарбоксилазы, ингибиторы MAO-B, такие как селегилин и разагилин, антихолинэргические средства и амантадин.

Амиотрофический латеральный склероз (ALS/болезнь Лу Герига) представляет собой заболевание, при котором двигательные нейроны подвергаются селективному нацеливанию для дегенерации. Иллюстративные виды терапии ALS включают в себя рилузол, баклофен, диазепам, тригексифенидил и амитриптилин.

Другие иллюстративные нейродегенеративные терапевтические средства включают в себя анти-смысловые олигонуклеотиды и стволовые клетки.

Заживление раны.

Раны представляют собой тип состояния, характеризующегося повреждением клеток или тканей. Заживление раны представляет собой динамический путь, который оптимально приводит к восстановлению целостности и функции ткани. Процесс заживления раны состоит из трех перекрывающихся фаз. Первая фаза представляет собой воспалительную фазу, которая характеризуется гомеостазом, агрегацией тромбоцитов и дегрануляцией. Тромбоциты в качестве первого ответа, высвобождают множественные факторы роста для рекрутинга иммунных клеток, эпителиальных клеток и эндотелиальных клеток. Фаза воспаления, как правило, длится в течение 0-5 дня. Вторая стадия заживления раны представляет собой пролиферативную фазу, в ходе которой макрофаги и гранулоциты проникают в рану. Инфильтрирующие фибробласты начинают производить коллаген. Принципиальные характеристики этой фазы представляют собой эпителизацию, ангиогенез, формирование грануляционной ткани и продукцию коллагена. Проллиферативная фаза, как правило, длится в течение 3-14 дня. Третья фаза представляет собой фазу ремоделирования, когда происходит образование матрикса. Фибробласты, эпителиальные клетки и эндотелиальные клетки продолжают производить коллаген и коллагеназу, а также металлопротеиназы клеточного матрикса (ММР) для ремоделирования. Происходит образование перекрестных связей коллагена и рана закрывается. Фаза ремоделирования, как правило, происходит с 7 дня до одного года.

Описанные в настоящем документе соединения и композиции можно использовать для стимуляции заживления раны (например, стимуляции или ускорения закрытия раны и/или заживления раны, уменьшения рубцового фиброза ткани раны и/или вокруг раны, ингибирования апоптоза клеток, окружающих или находящихся вблизи раны). Таким образом, согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение включает способ стимуляции заживления раны у субъекта, включающий введение субъекту соединения (например, ингибитора CRM1) или его фармацевтически приемлемой соли или композиции. Способ необязательно должен достигать полного заживления или закрытия раны; для способа достаточно стимулировать любую степень закрытия раны. В этом отношении способ можно использовать отдельно или в качестве дополнения к другим способам для заживления раненной ткани.

Описанные в настоящем документе соединения и композиции можно использовать для лечения ран в ходе воспалительной (или ранней) фазы, в ходе пролиферативной (или средней) фазы заживления раны и/или в ходе фазы ремоделирования (или последней) фазы заживления раны.

Согласно некоторым вариантам осуществления нуждающийся в заживлении раны субъект представляет собой человека или животное, например лошадь, свинью или такого грызуна, как мышь.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе соединения и композиции, применимые для заживления раны, вводят местно, например, вблизи от локализации раны, или системно.

Более конкретно, описанное в настоящем документе соединение или композицию можно вводить (необязательно в комбинации с другими средствами) на место раны, покрывая рану или нанося бинт,

уплотнитель, шовные материалы т.д., которые покрывают или обрабатывают с помощью описанного в настоящем документе соединения или композиции. В связи с этим описанные в настоящем документе соединения и композиции могут быть введены в состав для местного введения для лечения поверхностных ран. Местные составы включают в себя составы для доставки через рот (буккальные) и на кожу так, чтобы слой кожи (т.е. эпидермис, дерма и/или подкожный слой) контактировал с описанным в настоящем документе соединением или композицией. Системы для местной доставки можно использовать для введения местных составов описанных в настоящем документе соединений и композиций.

Альтернативно, описанные в настоящем документе соединения и композиции можно вводить на или вблизи места раны с помощью, например, инъекции раствора, инъекции состава пролонгированного высвобождения или введения биоразлагаемого имплантата, содержащего соединение или композицию, описанные в настоящем документе.

Описанные в настоящем документе соединения и композиции можно использовать для лечения острых ран или хронических ран. Хроническая рана является результатом прерывания нормального репаративного процесса. Хронические раны могут развиваться из острых повреждений в результате неустановленных персистирующих инфекций или неадекватного первичного лечения. В большинстве случаев, тем не менее, хронические поражения представляют собой конечную стадию прогрессирующего разрушения тканей вследствие венозного, артериального или метаболического сосудистого заболевания, пролежней, лучевого повреждения или опухолей.

При хронических ранах заживление не происходит по различным причинам, включая в себя неадекватное кровообращение в диабетических язвах, значительный некроз, такой как при ожогах, и инфекции. При указанных хронических ранах жизнеспособность или фаза восстановления зачастую представляет собой стадию, ограничивающую скорость процесса. Клетки больше не являются жизнеспособными и, таким образом, начальная фаза восстановления пролонгируется за счет неблагоприятного окружения раневого ложа.

Хронические раны включают в себя без ограничения следующее: хронические ишемические кожные поражения; язвы при склеродермии; артериальные язвы; язвы диабетической стопы; пролежни; венозные язвы; незаживающие язвы нижней конечности; язвы вследствие воспалительных состояний; и/или длительные раны.

Согласно конкретному варианту осуществления описанные в настоящем документе соединения и композиции можно использовать для заживления диабетических ран или ускорения заживления язв ноги и стопы, которые являются вторичными при сахарном диабете или ишемии у субъекта.

Согласно одному варианту осуществления рана представляет собой поверхностную рану. Согласно другому варианту осуществления рана представляет собой операционную рану (например, абдоминальную операционную рану или операционную рану желудочно-кишечного тракта). Согласно дополнительному варианту осуществления рана представляет собой ожог. Согласно другому варианту осуществления рана представляет собой результат лучевого воздействия.

Описанные в настоящем документе соединения и композиции также можно использовать для заживления диабетических ран, заживления ран желудочно-кишечного тракта или заживления рубцового сращения вследствие, например, операции.

Описанные в настоящем документе соединения и композиции также можно использовать для заживления ран, которые являются вторичными относительно другого заболевания. Например, при воспалительных кожных заболеваниях, таких как псориаз и дерматит, существуют многочисленные случаи кожных поражений, которые являются вторичными по отношению к заболеванию, и они вызываются глубоким растрескиванием кожи или царапанием кожи. Описанные в настоящем документе соединения и композиции можно использовать для заживления ран, которые являются вторичными указанным заболеваниям, например воспалительным кожным заболеваниям, таким как псориаз и дерматит.

Согласно дополнительному варианту осуществления рана представляет собой внутреннюю рану. Согласно конкретному аспекту внутренняя рана представляет собой хроническую рану. Согласно другому конкретному аспекту рана представляет собой рану сосуда. Согласно другому конкретному аспекту внутренняя рана представляет собой язву.

Примеры ран включают в себя без ограничения следующее: ссадины, рваные раны, открытые раны грудной стенки (т.е. открытый пневмоторакс), ожоговые раны, закрытые раны, огнестрельные раны, резаные раны, открытые раны, проникающие раны, сквозные раны, колотые раны, лигатурные раны, ножевые раны, операционные раны, подкожные раны, диабетические поражения или касательные раны. Дополнительные примеры ран, которые можно лечить с помощью описанных в настоящем документе соединений и композиций, включают в себя острые состояния или раны, такие как термические ожоги, химические ожоги, лучевые ожоги, ожоги, вызванные избыточным воздействием ультрафиолетового облучения (например, солнечные ожоги); повреждение тканей организма, например промежности в результате трудовой деятельности или деторождения; повреждения, длящиеся во время медицинских процедур, такие как эпизиотомии; вызванные травмами повреждения, включая в себя порезы, надрезы, ссадины; повреждения, продолжающиеся после несчастных случаев; послеоперационные повреждения, а также хронические состояния, такие как намины, пролежни, состояния, связанные с сахарным диабетом и пло-

хим кровообращением и все типы акне. Кроме того, рана может включать в себя дерматит, такой как импетиго, опрелости, фолликулит и экзема, раны после стоматологической операции; пародонтальное заболевание; раны после травмы и связанные с опухолью раны. Другие примеры ран включают в себя следующее: укусы животных, заболевание артерий, укусы и жала насекомых, костные инфекции, дефектные трансплантаты кожи/мышц, гангрена, разрывы кожи или резаные раны, старение кожи, хирургические разрезы, включая в себя медленно заживающие или незаживающие операционные раны, кровоизлияние в головной мозг, аневризма, астеническая реакция кожи и послеоперационные инфекции.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления рана выбрана из группы, состоящей из следующего: ожоговая рана, резаная рана, открытая рана, операционная или послеоперационная рана, диабетическое повреждение, термический ожог, химический ожог, лучевой ожог, намин, пролежень и состояние, связанное с сахарным диабетом или плохим кровообращением.

Настоящее раскрытие также относится к способам и композициям снижения образования рубца во время заживления раны у субъекта. Описанные в настоящем документе соединения и композиции могут быть введены непосредственно на рану или на клетки, прилежащие к ране в количестве, эффективном для снижения образования рубца в ране и/или вокруг нее.

Рана может включать в себя любое повреждение любой части организма субъекта. Согласно вариантам осуществления предусмотрены способы для улучшения, снижения или уменьшения образования рубцов у субъекта, который пострадал от ожогового повреждения. Согласно предпочтительным вариантам осуществления предусмотрены способы для лечения, снижения возникновения или снижения вероятности развития гипертрофических рубцов у субъекта, который пострадал от острой или хронической раны или повреждения.

Другие нарушения.

Описанные в настоящем документе соединения и композиции также могут применяться для лечения нарушений аномального роста и фиброза тканей, включая в себя расширяющуюся кардиомиопатию, гипертрофическую кардиомиопатию, рестриктивную кардиомиопатию, фиброз легких, фиброз печени, гломерулонефрит и другие нарушения почек.

Комбинированная лучевая терапия.

Описанные в настоящем документе соединения и композиции применимы в качестве радиосенсибилизаторов. Следовательно, описанные в настоящем документе соединения и композиции могут быть введены в комбинации с лучевой терапией. Лучевая терапия представляет собой медицинское применение излучения высокой энергии (например, рентгеновских лучей, гамма лучей, заряженных частиц) для сокращения размеров опухолей и уничтожения злокачественных клеток, и, как правило, ее используют как часть противоракового лечения. Лучевая терапия уничтожает злокачественные клетки путем повреждения их ДНК.

Лучевая терапия может быть доставлена пациенту несколькими путями. Например, ионизирующее излучение может быть доставлено из внешнего источника, такого как устройство вне организма пациента, как в наружной дистанционной лучевой терапии. Наружная дистанционная лучевая терапия для лечения злокачественной опухоли использует источник излучения, который является внешним по отношению к пациенту, как правило, или радиоизотоп, такой как ^{60}Co , ^{137}Cs , или источник рентгеновских лучей высокой энергии, такой как линейный ускоритель. Внешний источник производит пучок параллельных лучей, направленный пациенту на место опухоли. Наружная дистанционная лучевая терапия дает возможность избежать некоторые проблемы лучевой терапии с внутренним источником, но она нежелательным образом и обязательно облучает значительный объем неопухолевой или здоровой ткани по пути следования пучка излучения наряду с опухолевой тканью.

Неблагоприятный эффект облучения здоровой ткани может быть снижен, при сохранении данной дозы ионизирующего излучения в опухолевой ткани, путем проецирования наружного пучка излучения на пациента при разнообразных "поворотных" углах с пучками, сходящимися на месте опухоли. Конкретные объемные элементы здоровой ткани по ходу пучка излучения изменяются, снижая общую дозу на каждом таком элементе здоровой ткани в ходе всего лечения.

Ионизирующее излучение здоровой ткани также может быть снижено с помощью точной коллимации пучка ионизирующего излучения на общее поперечное сечение опухоли, взятое перпендикулярно оси пучка ионизирующего излучения. Существуют различные системы для получения такой круговой коллимации, некоторые из которых используют множественные шибберные затворы, которые, фрагментарно, могут генерировать непрозрачный для излучения защитный экран произвольным образом.

Для введения наружного дистанционного облучения количество может составлять по меньшей мере приблизительно 1 грей (Гр) за один сеанс облучения по меньшей мере один раз через день на обрабатываемый объем. Согласно конкретному варианту осуществления ионизирующее излучение вводят в дозе по меньшей мере приблизительно 2 грей (Гр) за один сеанс облучения по меньшей мере один раз в день на обрабатываемый объем. Согласно другому конкретному варианту осуществления ионизирующее излучение вводят в дозе по меньшей мере приблизительно 2 грей (Гр) за один сеанс облучения по меньшей мере один раз в день на обрабатываемый объем в течение пяти последовательных дней в неделю. Согласно другому конкретному варианту осуществления ионизирующее излучение вводят в дозе 10 Гр за

один сеанс облучения через день, три раза в неделю на обрабатываемый объем. Согласно другому конкретному варианту осуществления общую дозу, составляющую по меньшей мере приблизительно 20 Гр, вводят нуждающемуся в этом пациенту. Согласно другому конкретному варианту осуществления по меньшей мере приблизительно 30 Гр вводят нуждающемуся в этом пациенту. Согласно другому конкретному варианту осуществления по меньшей мере приблизительно 40 Гр вводят нуждающемуся в этом пациенту.

Как правило, пациент получает наружную дистанционную лучевую терапию четыре или пять раз в неделю. Полный курс лечения, как правило, длится от одной до семи недель в зависимости от типа злокачественной опухоли и цели лечения. Например, пациент может получать дозу, составляющую 2 Гр/день в течение 30 дней.

Внутренняя лучевая терапия представляет собой локализованную лучевую терапию, что означает, что источник излучения размещается в месте опухоли или в пораженной области. Внутренняя лучевая терапия может быть доставлена путем размещения источника излучения внутри или вблизи области, нуждающейся в лечении. Внутренняя лучевая терапия также называется брахитерапией. Брахитерапия включает в себя интракавитарное лечение и интерстициальное лечение. При интракавитарном лечении контейнеры, которые содержат радиоактивные источники, помещают в опухоль или вблизи нее. Источники помещают в полости организма. При интерстициальном лечении радиоактивные источники отдельно помещают в опухоль. Указанные радиоактивные источники могут постоянно оставаться в организме пациента. Как правило, радиоактивные источники удаляют из организма пациента через несколько дней. Радиоактивные источники находятся в контейнерах.

Существует ряд способов введения радиофармацевтического средства. Например, радиофармацевтическое средство можно ввести с помощью нацеленной доставки или системной доставки нацеленных радиоактивных конъюгатов, таких как меченное радиоактивным изотопом антитело, меченный радиоактивным изотопом пептид и липосомная система доставки. Согласно одному конкретному варианту осуществления нацеленной доставки меченное радиоактивным изотопом фармацевтическое средство может представлять собой меченное радиоактивным изотопом антитело. См., например, Ballangrud A.M., et al., *Cancer Res.*, 2001; 61:2008-2014 and Goldenber, D.M. *J. Nucl. Med.*, 2002; 43(5):693-713, содержание которой включено посредством ссылки в настоящий документ.

Согласно другому конкретному варианту осуществления нацеленной доставки радиофармацевтического средства можно ввести в форме липосомных систем доставки, таких как небольшие моноламеллярные везикулы, большие моноламеллярные везикулы и мультисламеллярные везикулы. Липосомы могут быть образованы из разнообразных фосфолипидов, таких как холестерин, стеариламин или фосфатидилхолины. См., например, Emfietzoglou D., Kostarelos K., Sgouros G. *An analytical dosimetry study for the use of radionuclide-liposome conjugates in internal radiotherapy. J. Nucl. Med.* 2001; 42:499-504, содержание которой включено посредством ссылки в настоящий документ.

Согласно другому конкретному варианту осуществления нацеленной доставки меченное радиоактивным изотопом фармацевтическое средство может представлять собой меченный радиоактивным изотопом пептид. См., например, Weiner R.E., Thakur M.L. *Radiolabeled peptides in the diagnosis and therapy of oncological diseases. Appl. Radiat. Isot.* 2002 Nov; 57(5):749-63, содержание которой включено посредством ссылки в настоящий документ.

В дополнение к нацеленной доставке брахитерапию можно использовать для доставки радиофармацевтического средства к целевому сайту. Брахитерапия представляет собой технику, которая помещает источники излучения так близко к месту опухоли, насколько это возможно. Зачастую источник вводят непосредственно в опухоль. Радиоактивные источники могут находиться в форме провода, радиоактивные зерна или прута. Как правило, используют цезий, иридий или йод.

Системная лучевая терапия представляет собой другой тип лучевой терапии, и он включает применение радиоактивных веществ в крови. Системная лучевая терапия представляет собой форму таргетной терапии. При системной лучевой терапии пациент, как правило, принимает внутрь или получает инъекцию радиоактивного вещества, такого как радиоактивный йод, или радиоактивного вещества, связанного с моноклональным антителом.

Определяемый в настоящем документе термин "радиофармацевтическое средство" относится к фармацевтическому средству, которое содержит по меньшей мере один испускающий излучение радиоизотоп. Радиофармацевтические средства рутинно используются в медицинской радиологии для диагностики и/или терапии различных заболеваний. Меченное радиоактивным изотопом фармацевтическое средство, например меченное радиоактивным изотопом антитело, содержит радиоизотоп (RI), который служит в качестве источника излучения. Предусмотренный в настоящем документе термин "радиоизотоп" включает в себя металлические и неметаллические радиоизотопы. Радиоизотоп выбирают на основании медицинского применения меченных радиоактивным изотопом фармацевтических средств. Если радиоизотоп представляет собой металлический радиоизотоп, как правило, используют хелатор для связывания металлического радиоизотопа с остальной молекулой. Если радиоизотоп представляет собой неметаллический радиоизотоп, неметаллический радиоизотоп, как правило, связывается напрямую или через линкер с остальной молекулой.

Используемый в настоящем документе термин "металлический радиоизотоп" представляет собой любой подходящий металлический радиоизотоп, применимый в терапевтической или диагностической процедуре *in vivo* или *in vitro*. Подходящие металлические радиоизотопы включают в себя без ограничения актиний-225, сурьма-124, сурьма-125, мышьяк-74, барий-103, барий-140, бериллий-7, висмут-206, висмут-207, висмут-212, висмут-213, кадмий-109, кадмий-115m, кальций-45, церий-139, церий-141, церий-144, цезий-137, хром-51, кобальт-55, кобальт-56, кобальт-57, кобальт-58, кобальт-60, кобальт-64, медь-60, медь-62, медь-64, медь-67, эрбий-169, европий-152, галлий-64, галлий-67, галлий-68, гадолиний-153, гадолиний-157, золото-195, золото-199, гафний-175, гафний-175-181, гольмий-166, индий-110, индий-111, иридий-192, железо-55, железо-59, криптон-85, свинец-203, свинец-210, лютеций-177, марганец-54, ртуть-197, ртуть-203, молибден-99, неодим-147, нептуний-237, никель-63, ниобий-95, осмий-185+191, палладий-103, палладий-109, платина-195m, празеодим-143, прометий-147, прометий-149, протактиний-233, радий-226, рений-186, рений-188, рубидий-86, рутений-97, рутений-103, рутений-105, рутений-106, самарий-153, скандий-44, скандий-46, скандий-47, селен-75, серебро-110m, серебро-111, натрий-22, стронций-85, стронций-89, стронций-90, сера-35, тантал-182, технеций-99m, теллур-125, теллур-132, таллий-204, торий-228, торий-232, таллий-170, олово-113, олово-114, олово-117m, титан-44, вольфрам-185, ванадий-48, ванадий-49, иттербий-169, иттрий-86, иттрий-88, иттрий-90, иттрий-91, цинк-65, цирконий-89 и цирконий-95.

Используемый в настоящем документе термин "неметаллический радиоизотоп" представляет собой любой подходящий неметаллический радиоизотоп, применимый в терапевтической или диагностической процедуре *in vivo* или *in vitro*. Подходящие неметаллические радиоизотопы включают в себя без ограничения йод-131, йод-125, йод-123, фосфор-32, аstat-211, фтор-18, углерод-11, кислород-15, бром-76 и азот-13.

Идентификация наиболее приемлемого изотопа для лучевой терапии требует взвешивания разнообразных факторов. Они включают в себя поглощение опухолью и удержание в опухоли, почечный клиренс, скорость доставки ионизирующего излучения, время полураспада и конкретную активность радиоизотопа и возможность осуществления крупномасштабного производства радиоизотопа экономическим способом. Ключевым вопросом для терапевтического радиофармацевтического средства является доставка необходимого количества дозы ионизирующего излучения к опухолевым клеткам и достижение цитотоксического или противоопухолевого эффекта, не вызывая при этом неконтролируемых побочных эффектов.

Предпочтительно, чтобы физический период полураспада терапевтического радиоизотопа был аналогичен биологическому периоду полураспада радиофармацевтического средства в месте опухоли. Например, если период полураспада радиоизотопа является слишком коротким, то в основном распад будет происходить до того, как радиофармацевтическое средство достигнет максимального соотношения мишень/фон. С другой стороны, слишком длительный период полураспада может вызвать нежелательную дозу ионизирующего излучения нормальных тканей. Оптимально, радиоизотоп должен характеризоваться достаточно длительным периодом полураспада для достижения минимальной мощности дозы и для облучения всех клеток в течение наиболее чувствительных к облучению фаз клеточного цикла. Кроме того, период полураспада радиоизотопа должен быть достаточно длинным для обеспечения адекватного времени для производства, высвобождения и транспортировки.

Другие практические соображения в выборе радиоизотопа для конкретного применения в противоопухолевой терапии представляют собой доступность и качество. Чистота должна быть достаточно и воспроизводимой, поскольку следовые количества примесей могут оказывать воздействие на мечение радиоизотопами и на радиохимическую чистоту радиофармацевтического средства.

Сайты целевых рецепторов в опухолях, как правило, ограничены в количестве. В связи с этим предпочтительно, чтобы радиоизотоп характеризовался высокой специфической активностью. Специфическая активность зависит, в первую очередь, от способа получения. Следовые примеси металлов необходимо минимизировать, поскольку они часто конкурируют с радиоизотопом за хелатор и их металлические комплексы конкурируют за связывание рецептора с меченным радиоактивным изотопом хелатирующим средством.

Тип излучения, который является подходящим для применения в способах согласно настоящему изобретению, может варьировать. Например, излучение может быть электромагнитным или корпускулярным по природе. Электромагнитное излучение, применимое в осуществлении на практике настоящего изобретения, включает в себя без ограничения рентгеновские лучи и γ -лучи. Корпускулярное излучение, применимое в осуществлении на практике настоящего изобретения, включает в себя без ограничения пучки электронов (β -частицы), пучки протонов, пучки нейтронов, α -частицы и отрицательные пи-мезоны. Излучение может быть доставлено с применением традиционного устройства и способов радиологического лечения и с помощью интраоперационных и стереотаксических способов. Дополнительное обсуждение в отношении типов лучевой терапии, подходящих для применения в осуществлении на практике настоящего изобретения, можно найти в Steven A. Leibel et al., *Textbook of Radiation Oncology* (1998) (publ. W.B. Saunders Company) и, в частности, в гл. 13 и 14. Ионизирующее излучение также может быть

доставлено другими способами, такими как нацеленная доставка, например, с помощью радиоактивных "зерен", или с помощью системной доставки нацеленных радиоактивных конъюгатов. J. Padawer et al., Combined Treatment with Radioestradiol lucanthone in Mouse C3HBA Mammary Adenocarcinoma and with Estradiol lucanthone in an Estrogen Bioassay, *Int. J. Radial Oncol. Biol. Phys.* 7:347-357 (1981). Другие способы доставки ионизирующего излучения можно использовать в практическом осуществлении настоящего изобретения.

Для противоопухолевой терапии предусмотрены эмиттеры как α -, так и β -частиц. α -Частицы представляют собой особенно благоприятные цитотоксические средства, поскольку они рассеивают большое количество энергии в пределах одного или двух клеточных диаметров. Эмиттеры β -частиц характеризуются относительно большую дальность проникновения (2-12 мм в ткани) в зависимости от энергетического уровня. Большая дальность проникновения особенно важна для солидных опухолей, которые характеризуются гетерогенным кровотоком и/или экспрессией рецепторов. Эмиттеры β -частиц дают в результате более однородное распределение дозы, даже если они гетерогенно распределены в пределах целевой ткани.

Согласно конкретному варианту осуществления терапевтически эффективные количества описанных в настоящем документе соединений и композиций вводят в комбинации с терапевтически эффективным количеством лучевой терапии для лечения злокачественной опухоли (например, рака легких, такого как немелкоклеточный рак легких). Необходимое количество ионизирующего излучения может быть определено специалистом в настоящей области техники на основании известных доз для конкретного типа злокачественной опухоли. См., например, *Cancer Medicine* 5th ed., Edited by R.C. Bast et al., July 2000, BC Decker.

Вышеизложенное раскрытие описывает настоящее изобретение в общем. Более полное понимание можно получить, ссылаясь на последующие конкретные примеры. Указанные примеры описаны исключительно для целей иллюстрации и не предусмотрены для ограничения объема настоящего изобретения. Изменения в форме и замена эквивалентов предусмотрены в той мере, в какой могут предлагать или делать их целесообразными обстоятельства. Несмотря на то, что конкретные термины были использованы в настоящем документе, указанные термины предусмотрены в описательном смысле, а не для целей ограничения.

Примеры

Сокращения.

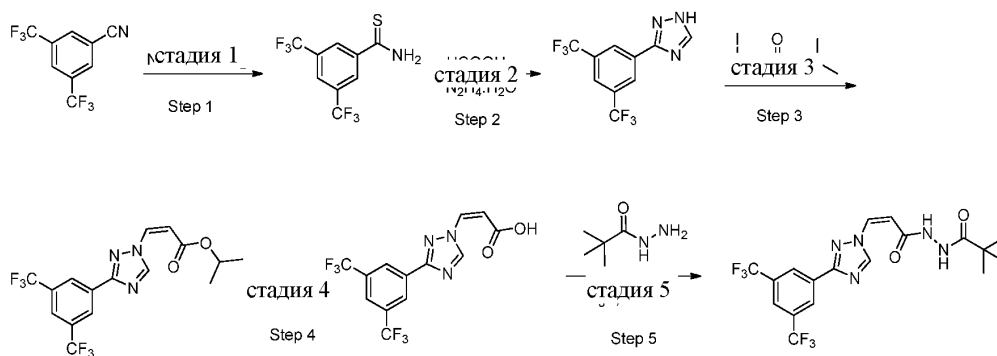
водн.	водный
Вос	трет-бутоксикарбонил
CH ₂ Cl ₂	дихлорметан
DAVCO	1,4-диазабицикло[2,2,2]октан
DIPEA	N,N-диизопропилэтиламин
DMF	N,N-диметилформамид
ДМСО	диметилсульфоксид
экв.	эквивалент(ы)
EtOAc	этилацетат
EtOH	этанол
ч	час(ы)
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ЖХ-МС	комбинация жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии
LiOH	гидроксид лития
ЯМР	ядерный магнитный резонанс
RT	комнатная температура или время удерживания
T3P	пропилфосфоновый ангидрид
TFA	трифторуксусная кислота
THF	тетрагидрофуран

В последующем описании указанных способов следует понимать, что там, где это уместно, будут добавлены подходящие защитные группы и впоследствии удалены из различных реагентов и промежуточных соединений тем способом, который будет понятным специалисту в настоящей области органического синтеза. Общеизвестные процедуры для применения таких защитных групп, а также примеры подходящих защитных групп описаны, например, в "Protective Groups in Organic Synthesis", T.W. Green,

P.G.M. Wuts, Wiley-Interscience, New York, (1999). Также следует понимать, что превращение группы или заместителя в другую группу или заместитель путем химической манипуляции можно провести на любом промежуточном соединении или конечном продукте на пути синтеза в направлении конечного продукта, в котором возможный тип превращения ограничен только исходной несовместимостью других функциональных групп, которые содержит молекула на указанной стадии, с условиями или реагентами, используемыми в превращении. Такие исходные несовместимости и пути их преодоления путем проведения соответствующих превращений и стадий синтеза в подходящем порядке, будут понятны специалисту в настоящей области органического синтеза. Примеры превращений представлены ниже, и следует понимать, что описанные превращения не ограничены только типичными группами или заместителями, для которых превращения проиллюстрированы. Ссылки и описания других подходящих превращений представлены в "Comprehensive Organic Transformations - A Guide to Functional Group Preparations" R.C. Larock, VHC Publishers, Inc. (1989). Ссылки и описания других подходящих реакций описаны в учебниках по органической химии, например "Advanced Organic Chemistry", March, 4th ed. McGraw Hill (1992) или "Organic Synthesis", Smith, McGraw Hill, (1994). Техники очистки промежуточных соединений и конечных продуктов включают в себя, например, хроматографию с нормальной фазой и обращенной фазой на колонке или вращающемся планшете, перекристаллизацию, дистилляцию и экстракцию жидкостью жидкостью или экстракцию твердого вещества жидкостью, которые будут понятны специалисту в настоящей области техники. Определения заместителей и групп являются такими, как в формуле I, за исключением тех случаев, в которых определено иначе. Термин "комнатная температура" и "окружающая температура" должен подразумевать, если не установлено иное, температуру от 16 до 25°C. Термин "дефлегмировать" должен подразумевать, если не установлено иное, со ссылкой на используемый растворитель, температуру равную или выше точки кипения указанного растворителя.

Пример 1. Синтез (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-пивалоил-акрилогидразида (соединения 1).

Соединение 1 синтезировали согласно следующей схеме:



3,5-бис(Трифторметил)бензотиоамид (стадия 1).

2 л трехгорлую круглодонную колбу заполняли раствором 3,5-бис(трифторметил)бензонитрила (200 г) в DMF (1 л). Раствор затем обрабатывали с помощью NaSH (123,7 г, 2,0 экв.) и MgCl₂ (186,7 г, 1,0 экв.) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Смесь выливали в суспензию льда и воды (10 л) и соединение экстрагировали с помощью EtOAc (3×1 л). Комбинированные органические слои отмывали с помощью водного насыщенного раствора хлорида натрия (3×100 мл), высушивали на безводном Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при отрицательном давлении для получения 205 г высушенного сырого 3,5-бис(трифторметил)бензотиоамида (выход: 90%), который применяли без дополнительной очистки в следующей стадии.

3-(3,5-бис(Трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол (стадия 2).

5 л трехгорлую круглодонную колбу заполняли раствором 3,5-бис(трифторметил)бензотиоамида (205,65 г) в DMF (1,03 л). Гидрат гидразина (73,2 мл, 2,0 экв.) добавляли по каплям и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. HCOOH (1,03 л) добавляли по каплям и реакционную смесь дефлегмировали при 90°C в течение 3 ч. После остывания до комнатной температуры реакционную смесь выливали в насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (7 л) и экстрагировали с помощью EtOAc (3×1 л). Комбинированные органические слои отмывали с помощью водного насыщенного раствора хлорида натрия (3×500 мл), высушивали на безводном Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при отрицательном давлении (35°C, 20 мм рт.ст.) для получения 180 г сырого продукта. Сырой материал перемешивали с петролейным эфиром (3×500 мл), фильтровали и высушивали для получения 160 г высушенного 3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазола, полученного в виде бледно-желтого твердого вещества (выход: 75%).

(Z)-изопропил 3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилат (стадия 3).

2 л трехгорлую круглодонную колбу заполняли раствором 3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазола (160 г) в DMF (960 мл). Раствор обрабатывали с помощью DABCO (127,74 г, 2 экв.) и пе-

ремешивали в течение 30 мин перед добавлением (Z)-изопропил 3-йодакрилат (150,32 г, 1,1 экв.) по каплям. Через 1 ч реакцию смесь выливали в суспензию льда и воды (5 л) и экстрагировали с помощью EtOAc (3×1 л). Комбинированные органические слои отмывали с помощью водного насыщенного раствора хлорида натрия (3×100 мл), высушивали на безводном Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при отрицательном давлении (35°C, 20 мм рт.ст.) для получения 250 г сырого продукта, который очищали путем колоночной хроматографии (силикагель 60/120) с применением градиента этилацетата/н-гексана (колонку упаковывали в гексан, и требуемое соединение начинало элюировать от концентрации 2% EtOAc/н-гексана). Содержащие требуемые соединения фракции комбинировали для получения (Z)-изопропил 3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилата (138 г, выход: 61%).

(Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акриловая кислота (стадия 4).

В 5 л трехгорлой круглодонной колбе (Z)-изопропил 3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилат (130 г, 1,0 экв.) растворяли в THF (1,3 л). Раствор LiOH (69,3 г, 5,0 экв.) в воде (1,3 л) добавляли по каплям к раствору и реакцию смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч перед тем, как погасить с помощью 400 мл суспензии льда и воды и подкислить (pH 2-3) с помощью разбавленной водной HCl. Смесь экстрагировали с помощью EtOAc (3×1 л) и комбинированные органические слои отмывали с помощью водного насыщенного раствора хлорида натрия, высушивали на безводном Na₂SO₄ и концентрировали при отрицательном давлении для получения 110 г (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акриловой кислоты (выход: 94%), (содержание цис 90,0%, содержание транс 8,2%, определенное с помощью ЖХ-МС).

(Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-пивалоилакрилогидразид (соединение 1).

В 50 мл трехгорлой круглодонной колбе (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акриловую кислоту (0,2 г, 1,0 экв.) растворяли в EtOAc (20 мл) и охлаждали до -60°C, куда пивало-гидразид (0,08 г, 1,2 экв.) вводили по каплям. ТЗР (50% в EtOAc) (0,4 мл, 4 экв.) добавляли по каплям с последующим добавлением DIPEA (0,4 мл, 4 экв.) и реакцию смесь перемешивали в течение 1 ч при -60°C. Реакционную смесь концентрировали при отрицательном давлении (25°C, 20 мм рт.ст.) для получения сырого продукта, который очищали путем колоночной хроматографии (силикагель 60/120) с применением градиента метанола/дихлорметана (колонку помещали в дихлорметан, и требуемое соединение начинало элюировать от концентрации 3% метанола/дихлорметана). Содержащие требуемые соединения фракции комбинировали для получения (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-пивалоилакрилогидразида (0,11 г, выход: 43%).

Пример 2. Синтез (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-(2-морфолиноацетил)акрилогидразида (соединения 2).

2-Морфолиноацетогидразид.

В 25 мл трехгорлой круглодонной колбе метил 2-морфолиноацетат (0,25 г, 1,0 экв.) растворяли в этаноле (5 мл) при комнатной температуре. Гидрат гидразина (0,087 г, 1,1 экв.) вводили по каплям при комнатной температуре и реакцию смесь дефлегмировали при 95°C в течение 20 ч. Реакционную смесь концентрировали при отрицательном давлении (40°C, 20 мм рт.ст.) для получения сырого 2-морфолиноацетогидразида (0,23 г), который применяли без дополнительной очистки в следующей стадии.

(Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-(2-морфолиноацетил)акрилогидразид (соединение 2).

В 50 мл трехгорлой круглодонной колбе (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акриловую кислоту (пример 1, стадия 4; 0,5 г, 1,0 экв.) растворяли в CH₂Cl₂:EtOAc (20 мл, 2:1) и охлаждали до -60°C, куда 2-морфолиноацетогидразид (0,23 г, 1,0 экв.) вводили по каплям. ТЗР (50% в EtOAc) (1,27 мл, 1,5 экв.) добавляли по каплям с последующим добавлением DIPEA (0,96 мл, 2 экв.) и реакцию смесь перемешивали в течение 1 ч при -60°C. Реакционную смесь концентрировали при отрицательном давлении (25°C, 20 мм рт.ст.) для получения сырого продукта, который очищали путем колоночной хроматографии (силикагель 60/120) с применением градиента метанола/дихлорметана (колонку помещали в дихлорметан, и требуемое соединение начинало элюировать от концентрации 3% метанола/дихлорметана). Содержащие требуемые соединения фракции комбинировали для получения (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-(2-морфолиноацетил)акрилогидразида (0,1 г, выход: 14%).

Пример 3. Синтез (Z)-N'-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)-5-метил-1H-пиразол-4-карбогидразида (соединения 3).

5-Метил-1H-пиразол-4-карбогидразид.

В 25 мл запаянной трубке этил 5-метил-1H-пиразол-4-карбоксилат (0,25 г, 1,0 экв.) растворяли в этаноле (5 мл) при комнатной температуре. Гидрат гидразина (1 мл, 5 экв.) вводили по каплям при комнатной температуре и реакцию смесь нагревали при 120°C в течение 20 ч. Реакционную смесь концентрировали при отрицательном давлении (40°C, 20 мм рт.ст.) для получения сырого 5-метил-1H-пиразол-4-карбогидразида (0,24 г), который применяли без дополнительной очистки в следующей стадии.

(Z)-N'-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)-5-метил-1H-пиразол-4-карбогидразид (соединение 3).

В 50 мл трехгорлой круглодонной колбе (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акриловую кислоту (пример 1, стадия 4; 0,5 г, 1,0 экв.) растворяли в EtOAc:EtOH (15 мл, 2:1) и охлаждали до -60°C, куда 5-метил-1H-пиразол-4-карбогидразид (0,24 г, 1,0 экв.) вводили по каплям. ТЗР (50% в EtOAc) (1,69 мл, 1,5 экв.) добавляли по каплям с последующим добавлением DIPEA (2 мл, 8 экв.) и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при -60°C. Реакционную смесь концентрировали при отрицательном давлении (25°C, 20 мм рт.ст.) для получения сырого продукта, который очищали путем колоночной хроматографии (силикагель 60/120) с применением градиента метанола/дихлорметана (колонку помещали в дихлорметан, и требуемое соединение начинало элюировать от концентрации 3% метанола/дихлорметана). Содержащие требуемые соединения фракции комбинировали для получения (Z)-N'-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)-5-метил-1H-пиразол-4-карбогидразида (0,2 г, выход: 42%).

Пример 4. Синтез (Z)-2-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)-N-циклопропилгидразинкарботиоамида (соединения 4).

В 50 мл трехгорлой круглодонной колбе (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акриловую кислоту (пример 1, стадия 4; 0,5 г, 1,0 экв.) растворяли в EtOAc:EtOH (15 мл, 2:1) и охлаждали до -60°C, куда N-циклопропилгидразинкарботиоамид (0,22 г, 1,2 экв.) вводили по каплям. ТЗР (50% в EtOAc) (1,69 мл, 2 экв.) добавляли по каплям с последующим добавлением DIPEA (1 мл, 4 экв.) и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при -60°C. Реакционную смесь концентрировали при отрицательном давлении (25°C, 20 мм рт.ст.) для получения сырого продукта, который очищали путем колоночной хроматографии (силикагель 60/120) с применением градиента метанола/дихлорметана (колонку помещали в дихлорметан, и требуемое соединение начинало элюировать от концентрации 3% метанола/дихлорметана). Содержащие требуемые соединения фракции комбинировали для получения (Z)-2-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)-N-циклопропилгидразинкарботиоамида (0,06 г, выход: 9%).

Пример 5. Синтез (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-метил-N'-(2-морфолиноацетил)акрилогидразида (соединения 5).

N-метил-2-морфолиноацетогидразид.

В 25 мл запаянной трубке метил 2-морфолиноацетат (0,5 г, 1,0 экв.) растворяли в этаноле (5 мл) при комнатной температуре. Метилгидразин (0,16 г, 1,1 экв.) вводили по каплям при комнатной температуре и реакционную смесь дефлегмировали при 95°C в течение 48 ч. Реакционную смесь концентрировали при отрицательном давлении (40°C, 20 мм рт.ст.) для получения сырого N'-метил-2-морфолиноацетогидразида (0,27 г), который применяли без дополнительной очистки в следующей стадии.

(Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-метил-N'-(2-морфолиноацетил)акрилогидразид (соединение 5).

В 50 мл трехгорлой круглодонной колбе (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акриловую кислоту (пример 1, стадия 4; 0,3 г, 1,0 экв.) растворяли в THF:EtOAc (15 мл, 2:1) и охлаждали до -60°C, куда N-метил-2-морфолиноацетогидразид (0,23 г, 1,5 экв.) вводили по каплям. ТЗР (50% в EtOAc) (1,27 мл, 2,5 экв.) добавляли по каплям с последующим добавлением DIPEA (0,45 мл, 3 экв.) и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при -60°C. Реакционную смесь концентрировали при отрицательном давлении (25°C, 20 мм рт.ст.) для получения сырого продукта, который очищали путем колоночной хроматографии (силикагель 60/120) с применением градиента метанола/дихлорметана (колонку помещали в дихлорметан, и требуемое соединение начинало элюировать от концентрации 3% метанола/дихлорметана). Содержащие требуемые соединения фракции комбинировали для получения (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-метил-N'-(2-морфолиноацетил) акрилогидразида (0,052 г, выход: 12%).

Пример 6. Синтез (Z)-N'-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)пиперидин-3-карбогидразид (соединение 6).

Пиперидин-3-карбогидразид.

В 30 мл запаянной трубке этилметилпиперидин-3-карбоксилат (1 г, 1,0 экв.) растворяли в этаноле (5 мл) при комнатной температуре. Гидрат гидразина (1,05 г, 3 экв.) вводили по каплям при комнатной температуре и реакционную смесь нагревали при 120°C в течение 20 ч. Реакционную смесь концентрировали при отрицательном давлении (40°C, 20 мм рт.ст.) для получения сырого пиперидин-3-карбогидразида (0,8 г), который применяли без дополнительной очистки в следующей стадии.

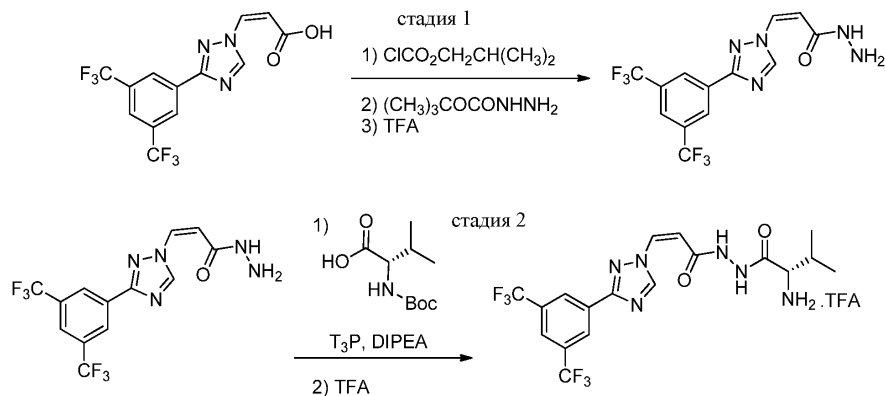
(Z)-N'-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)пиперидин-3-карбогидразид (соединение 6).

В 50 мл трехгорлой круглодонной колбе (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акриловую кислоту (пример 1, стадия 4; 0,25 г, 1,0 экв.) растворяли в THF:EtOAc (15 мл, 2:1) и охлаждали до -60°C, куда вводили по каплям пиперидин-3-карбогидразид (0,113 г, 1,1 экв.). ТЗР (50% в EtOAc) (1,69 мл, 4 экв.) добавляли по каплям с последующим добавлением DIPEA (0,25 мл, 2 экв.) и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при -60°C. Реакционную смесь концентрировали при от-

рицательном давлении (25°C, 20 мм рт.ст.) для получения сырого продукта, который очищали путем колоночной хроматографии (силикагель 60/120) с применением градиента метанола/дихлорметана (колонку помещали в дихлорметан, и требуемое соединение начинало элюировать от концентрации 3% метанола/дихлорметана). Содержащие требуемые соединения фракции комбинировали для получения (Z)-N'-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)пиперидин-3-карбогидрида (0,01 г, выход: 2,4%).

Пример 7. Синтез (S,Z)-2-амино-N'-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)-3-метилбутангидразид 2,2,2-трифторацетата (соединения 7).

Соединение 7 синтезировали по следующей схеме:



(Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилогидразид (стадия 1).

В 50 мл трехгорлой круглодонной колбе (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акриловую кислоту (пример 1, стадия 4; 0,5 г, 1,0 экв.) растворяли в THF (10 мл) и охлаждали до -10°C, куда добавляли NMP (0,3 г, 2,1 экв.) и реакционную смесь перемешивали в течение 5 мин. Затем добавляли изобутилхлорформиат (0,465 г, 2,4 экв.) и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч. Образованные твердые вещества удаляли путем фильтрации. Фильтрат охлаждали до 0°C и вводили трет-бутоксикарбонилгидразид (0,21 г, 1,1 экв.). Реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры при перемешивании в течение 1 ч. Реакционную смесь выливали в суспензию ледяной воды и экстрагировали с помощью EtOAc (3×50 мл). Комбинированные органические слои отмывали с помощью водного насыщенного раствора хлорида натрия (25 мл), высушивали на безводном Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при отрицательном давлении (25°C, 20 мм рт.ст.) для получения 0,5 г сырого продукта. Сырой продукт затем растворяли в THF (10 мл) и TFA (2 мл) добавляли по каплям при комнатной температуре и реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч. Реакционную смесь концентрировали при отрицательном давлении (25°C, 20 мм рт.ст.) и образованные твердые вещества растирали в порошок с помощью пентана для получения (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилогидрида (0,25 г, выход: 48,5%).

(S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилмасляная кислота.

В 25 мл трехгорлой круглодонной колбе (S)-2-амино-3-метилмасляную кислоту (0,8 г, 1,0 экв.) растворяли в воде (4 мл). Бикарбонат натрия (0,63 г, 1,1 экв.) с последующим ди-трет-бутилкарбонатом (2,97 г, 2,0 экв.) добавляли и реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь экстрагировали с помощью EtOAc (3×10 мл). Комбинированные органические слои отмывали с помощью водного насыщенного раствора хлорида натрия (25 мл), высушивали на безводном Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при отрицательном давлении (25°C, 20 мм рт.ст.) для получения 1,2 г сырого продукта, который очищали путем колоночной хроматографии (силикагель 60/120) с применением градиента метанола/дихлорметана (колонку помещали в дихлорметан, и требуемое соединение начинало элюировать от концентрации 3% метанола/дихлорметана). Содержащие требуемые соединения фракции комбинировали для получения (S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилмасляной кислоты (0,7 г, выход: 47,3%).

(S,Z)-2-амино-N'-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)-3-метилбутангидразид 2,2,2-трифторацетат (соединение 7).

В 10 мл круглодонной колбе (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилогидразид (0,25 г, 1,0 экв.) растворяли в THF (5 мл) и охлаждали до -60°C, куда вводили по каплям (S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилмасляную кислоту (0,19 г, 1,3 экв.). T3P (50% в EtOAc) (0,81 мл, 2 экв.) добавляли по каплям с последующим добавлением DIPEA (0,48 мл, 4 экв.) и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при -60°C. Реакционную смесь концентрировали при отрицательном давлении (25°C, 20 мм рт.ст.) для получения сырого продукта, который очищали путем колоночной хроматографии (силикагель 60/120) с применением градиента метанола/дихлорметана (колонку помещали в дихлорметан, и требуемое соединение начинало элюировать от концентрации 3% метанола/дихлорметана). Содержащие требуемые соединения фракции комбинировали для получения (S,Z)-трет-

бутил (1-(2-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)гидразинил)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамата (0,07 г, выход: 18%). В 10 мл круглодонной колбе (S,Z)-трет-бутил-(1-(2-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)гидразинил)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамат затем растворяли в дихлорметане (2 мл). Добавляли TFA (0,05 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч. Реакционную смесь концентрировали при отрицательном давлении (25°C, 20 мм рт.ст.) для получения сырого продукта (0,01 г), который растирали в порошок с петролейным эфиром и высушивали при отрицательном давлении для получения на выходе (S,Z)-2-амино-N'-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)-3-метилбутангидразид 2,2,2-трифторацетата (0,006 г, выход: 2%).

Пример 8. Синтез (Z)-N'-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)пипразин-2-карбогидразида (соединения 8).

В 25 мл трехгорлой круглодонной колбе (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)акриловую кислоту (пример 1, стадия 4; 0,5 г, 1,0 экв.) растворяли в дихлорметане (5 мл) и охлаждали до -60°C, куда вводили пипразин-2-карбогидразид (0,216 г, 1,1 экв.). ТЗР (50% в EtOAc) (3,39 мл, 4 экв.) добавляли по каплям с последующим добавлением DIPEA (0,5 мл, 2 экв.) и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при -60°C. Реакционную смесь концентрировали при отрицательном давлении (25°C, 20 мм рт.ст.) для получения сырого продукта, который очищали путем колоночной хроматографии (силикагель 60/120) с применением градиента метанола/дихлорметана (колодку помещали в дихлорметан, и требуемое соединение начинало элюировать от концентрации 3% метанола/дихлорметана). Содержащие требуемые соединения фракции комбинировали для получения (Z)-N'-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)пипразин-2-карбогидразида (0,13 г, выход: 19,4%).

Пример 9. Синтез (Z)-N'-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)-1-метилпиперидин-4-карбогидразида (соединения 9).

1-Метилпиперидин-4-карбогидразид.

В 25 мл запаянной трубке метил 1-метилпиперидин-4-карбоксилат (0,2 г, 1,0 экв.) растворяли в этаноле (5 мл) при комнатной температуре. Гидрат гидразина (0,127 г, 2 экв.) вводили по каплям при комнатной температуре и реакционную смесь нагревали при 120°C в течение 20 ч. Реакционную смесь концентрировали при отрицательном давлении (40°C, 20 мм рт.ст.) для получения сырого 1-метилпиперидин-4-карбогидразида (0,145 г), который применяли без дополнительной очистки в следующей стадии.

(Z)-N'-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)-1-метилпиперидин-4-карбогидразид (соединение 9).

В 50 мл трехгорлой круглодонной колбе (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)акриловую кислоту (0,25 г, 1,0 экв.) растворяли в EtOAc:THF (15 мл; 2:1) и охлаждали до -60°C, куда вводили 1-метилпиперидин-4-карбогидразид (0,123 г, 1,1 экв.). ТЗР (50% в EtOAc) (0,85 мл, 2 экв.) добавляли по каплям с последующим добавлением DIPEA (0,31 мл, 2,5 экв.) и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при -60°C. Реакционную смесь концентрировали при отрицательном давлении (35°C, 20 мм рт.ст.) для получения сырого продукта, который очищали путем колоночной хроматографии (силикагель 60/120) с применением градиента метанола/дихлорметана (колодку помещали в дихлорметан, и требуемое соединение начинало элюировать от концентрации 3% метанола/дихлорметана). Содержащие требуемые соединения фракции комбинировали для получения (Z)-N'-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)-1-метилпиперидин-4-карбогидразида (0,016 г, выход: 4,5%).

Пример 10. Синтез (R,Z)-2-амино-N'-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)-3-метилбутангидразид 2,2,2-трифторацетата (соединения 10).

(R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилмасляная кислота.

В 25 мл трехгорлой круглодонной колбе (R)-2-амино-3-метилмасляную кислоту (0,8 г, 1,0 экв.) растворяли в воде (4 мл). Добавляли бикарбонат натрия (0,394 г, 1,1 экв.) с последующим добавлением ди-трет-бутилдикарбоната (1,86 г, 2,0 экв.) и реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь экстрагировали с помощью EtOAc (3×10 мл). Комбинированные органические слои отмывали с помощью водного насыщенного раствора хлорида натрия (25 мл), высушивали на безводном Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при отрицательном давлении (25°C, 20 мм рт.ст.) для получения 0,75 г сырого продукта, который очищали путем колоночной хроматографии (силикагель 60/120) с применением градиента метанола/дихлорметана (колодку помещали в дихлорметан, и требуемое соединение начинало элюировать от концентрации 3% метанола/дихлорметана). Содержащие требуемые соединения фракции комбинировали для получения (R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилмасляной кислоты (0,44 г, выход: 47,3%).

(R,Z)-2-амино-N'-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)-3-метилбутангидразид 2,2,2-трифторацетат (соединение 10).

В 10 мл круглодонной колбе (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)акрилогидразид (0,05 г, 1,0 экв.) растворяли в THF (5 мл) и охлаждали до -60°C, куда вводили по кап-

лям (R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилмасляную кислоту (0,038 г, 1,3 экв.). ТЗР (50% в EtOAc) (0,16 мл, 2 экв.) добавляли по каплям с последующим добавлением DIPEA (0,095 мл, 4 экв.) и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при -60°C. Реакционную смесь концентрировали при отрицательном давлении (25°C, 20 мм рт.ст.) для получения сырого продукта, который очищали путем колоночной хроматографии (силикагель 60/120) с применением градиента метанола/дихлорметана (колону помещали в дихлорметан, и требуемое соединение начинало элюировать от концентрации 3% метанола/дихлорметана). Содержащие требуемые соединения фракции комбинировали для получения (R,Z)-трет-бутил (1-(2-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)гидразинил)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамата (0,017 г, выход: 26%). В 10 мл круглодонной колбе (R,Z)-трет-бутил (1-(2-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)гидразинил)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамат затем растворяли в дихлорметане (2 мл). Добавляли TFA (0,2 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч. Реакционную смесь концентрировали при отрицательном давлении (25°C, 20 мм рт.ст.) для получения сырого продукта (0,02 г), который растирали в порошок с петролейным эфиром и высушивали при отрицательном давлении для получения на выходе (R,Z)-2-амино-N'-(3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акрилоил)-3-метилбутангидразид 2,2,2-трифторацетата (0,007 г, выход: 35%).

Пример 11. Синтез (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-(2-(пиразин-2-ил)ацетил)акрилогидразида (соединения 11).

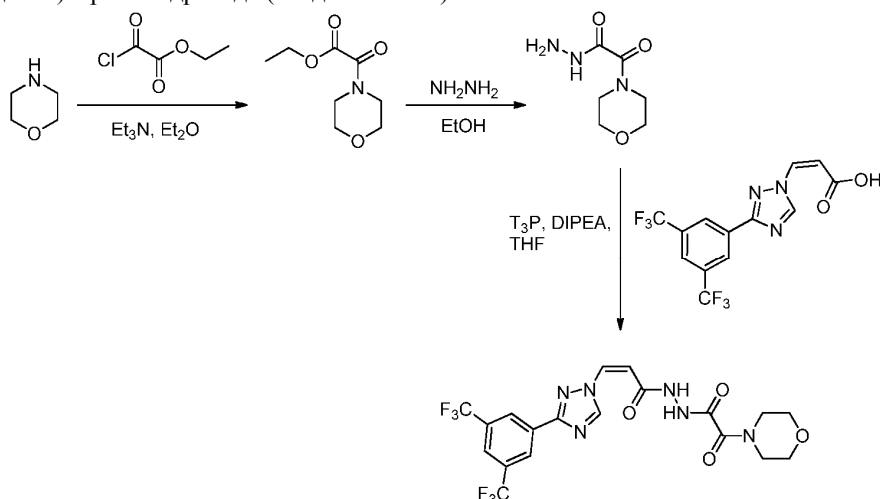
2-(Пиразин-2-ил)ацетогидразид.

В 25 мл запаянной трубке метил 2-(пиразин-2-ил)ацетат (0,25 г, 1,0 экв.) растворяли в этаноле (5 мл) при комнатной температуре. Гидрат гидразина (0,33 г, 4 экв.) вводили по каплям при комнатной температуре и реакционную смесь нагревали при 120°C в течение 20 ч. Реакционную смесь концентрировали при отрицательном давлении (40°C, 20 мм рт.ст.) для получения сырого 2-(пиразин-2-ил)ацетогидразида (0,2 г), который применяли без дополнительной очистки в следующей стадии.

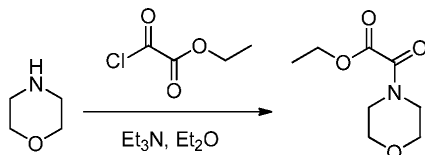
(Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-(2-(пиразин-2-ил)ацетил)акрилогидразид (соединение 11).

В 50 мл трехгорлой круглодонной колбе (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акриловую кислоту (0,3 г, 1,0 экв.) растворяли в EtOAc:THF (15 мл; 2:1) и охлаждали до -60°C, куда вводили 2-(пиразин-2-ил)ацетогидразид (0,129 г, 1,1 экв.). ТЗР (50% в EtOAc) (1,01 мл, 2 экв.) добавляли по каплям с последующим добавлением DIPEA (0,35 мл, 2,5 экв.) и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при -60°C. Реакционную смесь концентрировали при отрицательном давлении (25°C, 20 мм рт.ст.) для получения сырого продукта, который очищали путем колоночной хроматографии (силикагель 60/120) с применением градиента метанола/дихлорметана (колону помещали в дихлорметан, и требуемое соединение начинало элюировать от концентрации 3% метанола/дихлорметана). Содержащие требуемые соединения фракции комбинировали для получения (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-(2-(пиразин-2-ил)ацетил)акрилогидразида (0,025 г, выход: 5%).

Пример 12. Синтез (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-(2-морфолино-2-оксоацетил)акрилогидразида (соединения 12).



Синтез этил-2-морфолино-2-оксоацетата

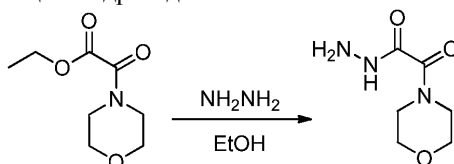


Раствор этил-2-хлор-2-оксоацетата (1,25 г, 9,18 ммоль) в простом диэтиловом эфире (5 мл) добавля-

ли по каплям к раствору морфолина (1,0 г, 11,48 ммоль) в простом диэтиловом эфире (20 мл) и триэтиламин (1,16 г, 11,48 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали при отрицательном давлении. Желтое масло переносили в 25 мл ледяной воды и экстрагировали с помощью этилацетата (3×20 мл). Комбинированные органические слои отмывали с помощью концентрированного солевого раствора, высушивали на безводном сульфате натрия и концентрировали при отрицательном давлении для получения 1 г сырого продукта, который применяли в дальнейшем без какой-либо очистки. Выход сырого продукта составлял 47%.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 4,33-4,38 (q, 2H), 3,72-3,76 (m, 4H), 3,65-3,68 (m, 2H), 3,47-3,50 (m, 2H), 1,37-1,40 (t, 3H). ЖХ-МС m/z 187,93 [M+H]⁺, t_R = 0,525 мин.

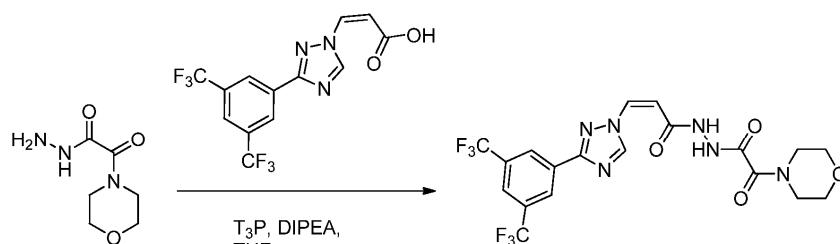
Синтез 2-морфолино-2-оксоацетогидразида



Этил-2-морфолино-2-оксоацетат (1,0 г, 5,34 ммоль) растворяли в этаноле (7 мл) и гидрат гидразина (0,267 г, 5,34 ммоль) добавляли по каплям при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 ч. Реакционную смесь концентрировали при отрицательном давлении для получения 0,9 г сырого продукта, который применяли без дополнительной очистки в следующей стадии. Выход сырого продукта составлял 90%.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 9,79 (s, 1H), 4,43-4,48 (m, 2H), 3,56-3,61 (m, 4H), 3,40-3,48 (m, 4H). ЖХ-МС m/z 174,16 [M+H]⁺, t_R = 2,031 мин.

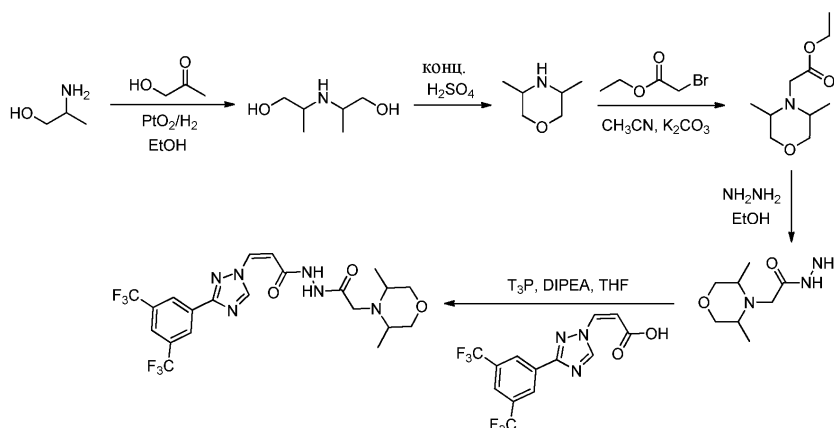
Синтез (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-(2-морфолино-2-оксоацетил)акрилогидразида



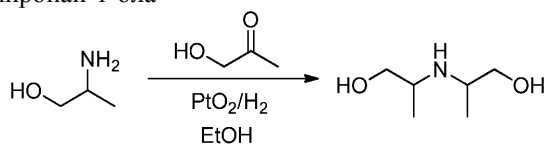
Раствор (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акриловой кислоты (0,2 г, 0,569 ммоль) и 2-морфолино-2-оксоацетогидразида (0,02 г, 0,175 ммоль) в THF (3 мл) охлаждали до -60°C. T₃P (0,098 г, 0,569 ммоль) (0,50 мл) добавляли по каплям с последующим добавлением DIPEA (0,11 г, 0,854 ммоль) и перемешивали при -60°C в течение 1 ч. Реакционную смесь переносили в 25 мл ледяной воды и экстрагировали с помощью этилацетата (2×25 мл). Комбинированные органические слои отмывали с помощью концентрированного солевого раствора, высушивали на безводном сульфате натрия и концентрировали при отрицательном давлении для получения 0,3 г сырого продукта, который очищали путем хроматографии (0-4% MeOH/CH₂Cl₂) для получения 0,15 г (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-(2-морфолино-2-оксоацетил)акрилогидразида (выход 50%).

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 10,70-10,88 (m, 2H), 9,56 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,52-7,55 (d, J = 10,4 Гц, 1H), 6,0-6,03 (d, J = 10,4 Гц, 1H), 3,51-3,64 (m, 8H). ЖХ-МС m/z 507,25 [M+H]⁺, t_R = 2,012 мин.

Пример 13. Синтез (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-(2-(3,5-диметилморфолино)ацетил)акрилогидразида (соединения 13).



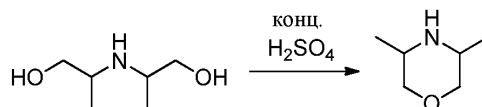
Синтез 2,2'-азанедиилдипропан-1-ола



2-Аминопропан-1-ол (5 г, 66,57 ммоль) и 1-гидроксипропан-2-он (5,77 г, 77,89 ммоль) растворяли в этаноле (115 мл) и добавляли 50 мг PtO_2 . Реакционную смесь перемешивали при давлении H_2 50 фунтов/дюйм² при комнатной температуре в течение 24 ч. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали при отрицательном давлении для получения сырого продукта, который применяли без дополнительной очистки в следующей стадии. Выход сырого продукта: 79%.

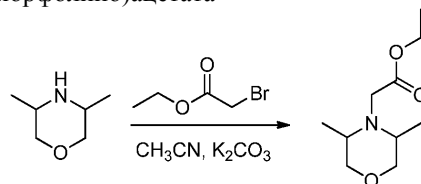
¹H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 4,45 (bs, 2H), 3,42-3,43 (m, 1H), 3,16-3,22 (m, 4H), 2,65-2,69 (m, 2H) 0,87-0,91(m, 6H). ЖХ-МС m/z 133,99 $[\text{M}+\text{H}]^+$ t_R : 4,077 мин.

Синтез 3,5-диметилморфолина



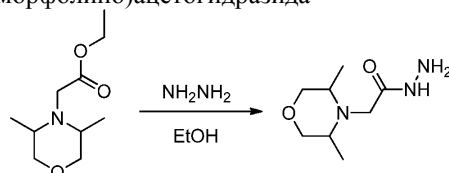
2,2'-Азанедиилдипропан-1-ол (7 г, 52 ммоль) суспендировали в концентрированной H_2SO_4 (5,3 мл, 99,8 ммоль) при комнатной температуре и нагревали при 180°C в течение 8 ч. Реакционную смесь охлаждали при 0°C и добавляли по каплям раствор KOH (11,79 г, 21,02 ммоль) в 60 мл воды. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат экстрагировали с помощью CHCl_3 :MeOH (85:15; 5×50 мл). Комбинированные органические слои высушивали на безводном сульфате натрия и концентрировали при отрицательном давлении для получения 3,5 г сырого продукта, который применяли без дополнительной очистки в следующей стадии (выход сырого продукта: 58%).

Синтез этил-2-(3,5-диметилморфолино)ацетата



Карбонат калия (0,311 г, 2,25 ммоль) и этилбромацетат (0,319 г, 1,91 ммоль) добавляли к раствору 3,5-диметилморфолина (0,2 г, 1,73 ммоль) в ацетонитриле (4 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при 60°C в течение 12 ч. Реакционную смесь переносили в ледяную воду и экстрагировали с помощью этилацетата (20 мл×3). Комбинированные органические слои отмывали с помощью концентрированного солевого раствора, высушивали на безводном Na_2SO_4 и концентрировали при отрицательном давлении для получения сырого продукта, который применяли в следующей стадии без дополнительной очистки (выход сырого продукта: 54%).

Синтез этил-2-(3,5-диметилморфолино)ацетогидразида

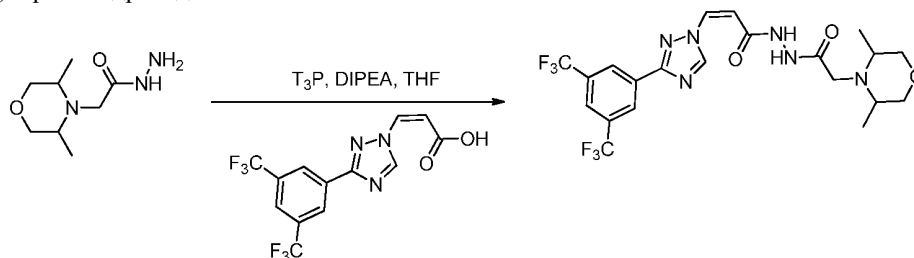


Этил-2-(3,5-диметилморфолино)ацетат (0,19 г, 0,944 ммоль) растворяли в этаноле (4 мл) и добавля-

ли по каплям гидрат гидразина (0,047 г, 0,944 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 80°C в течение 20 ч и реакционную смесь концентрировали при отрицательном давлении для получения сырого продукта, который применяли без дополнительной очистки в последующей стадии (выход сырого продукта: 97%).

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 8,95 (s, 2H), 8,84 (s, 1H), 3,60-3,63 (m, 2H), 3,25-3,29 (m, 2H), 3,14 (s, 2H), 3,05 (s, 2H), 0,86-0,88 (m, 6H). ЖХ-МС m/z 188,12 $[\text{M}+\text{H}]^+$, t_R 4,716 мин.

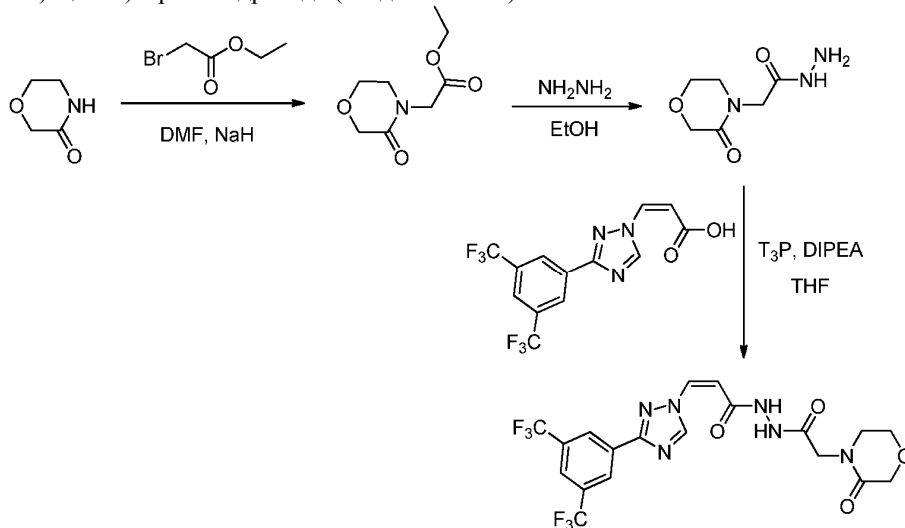
Синтез (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-(2-(3,5-диметилморфолино)ацетил)акрилогидразида



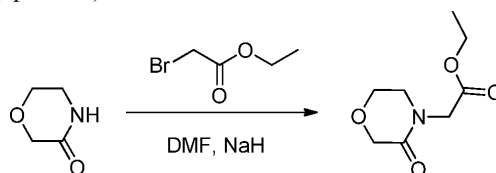
К раствору (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акриловой кислоты (0,2 г, 0,569 ммоль) и 2-(3,5-диметилморфолино)ацетогидразида (0,106 г, 0,569 ммоль) в THF (10 мл) добавляли ТЗР (0,543 г, 0,854 ммоль) с последующим добавлением DIPEA (0,110 г, 0,854 ммоль) при -60°C и перемешивали в течение 2 ч. Реакционную смесь переносили в 25 мл ледяной воды и экстрагировали с помощью этилацетата (2×25 мл) и комбинированные органические слои отмывали концентрированным соевым раствором, высушивали на безводном сульфате натрия и концентрировали при отрицательном давлении для получения сырого продукта, который очищали путем хроматографии (0-3% MeOH/ CH_2Cl_2) для получения 0,02 г (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-(2-(3,5-диметилморфолино)ацетил)акрилогидразида (выход: 7%).

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 10,58 (s, 1H), 9,83 (s, 1H), 9,56 (s, 1H), 8,54-8,56 (m, 2H), 8,25-8,30 (m, 1H), 7,49-7,51 (d, 7=10,4 Гц, 1H), 6,01-6,04 (d, 7=10,4 Гц, 1H), 3,44-3,57 (m, 2H), 3,28-3,34 (m, 2H), 3,21 (s, 1H), 3,15 (s, 1H), 2,84-2,88 (m, 2H), 0,93-1,04 (m, 6H). ЖХ-МС m/z 521,18 $[\text{M}+\text{H}]^+$, t_R 1,898 мин.

Пример 14. Синтез (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-(2-(3-оксоморфолино)ацетил)акрилогидразида (соединения 14).



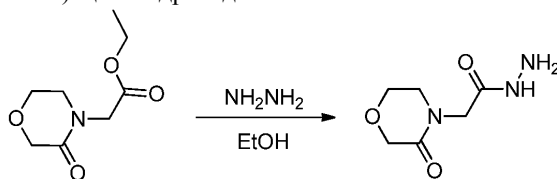
Синтез этил-2-(3-оксоморфолино)ацетата



Морфолин-3-он (3 г, 29,67 ммоль) растворяли в DMF (15 мл, 29,67 ммоль) и NaH (1,78 г, 44,51 ммоль) добавляли при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин и этилбромацетат (3,76 мл, 32,64 ммоль) добавляли по каплям. Реакционную смесь дополнительно перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч и переносили в 50 мл воды и экстрагировали с помощью EtOAc (3×50 мл). Комбинированные органические слои отмывали концентрированным соевым раствором (2×50 мл), высушивали на безводном сульфате натрия и концентрировали при отрица-

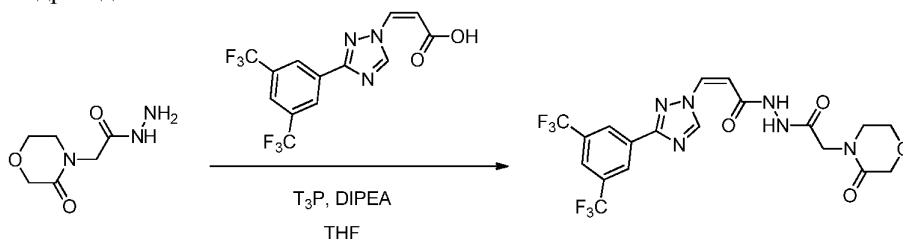
тельном давлении для получения сырого продукта, который очищали путем хроматографии (0-100% этилацетат/гексан) для получения 600 мг этил-2-(3-оксоморфолино)ацетата (выход: 10%). ЖХ-МС m/z 187 $[M+H]^+$, t_R 2,505 мин.

Синтез 2-(3-оксоморфолино)ацетогидрида



Этил-2-(3-оксоморфолино)ацетат (600 мг, 3,21 ммоль) растворяли в этаноле (3 мл) и гидрат гидразина (160,46 мг, 3,21 ммоль) добавляли при комнатной температуре. Реакционную смесь нагревали при 80°C в течение 1 ч. Реакционную смесь переносили в 50 мл воды и экстрагировали с помощью EtOAc (3×50 мл). Комбинированные органические слои отмывали концентрированным соевым раствором, высушивали на безводном сульфате натрия и концентрировали при отрицательном давлении для получения сырого продукта, который применяли без дополнительной очистки в последующей стадии (выход сырого продукта: 54%). ЖХ-МС m/z 174,05 $[M+H]^+$, t_R 2,489 мин.

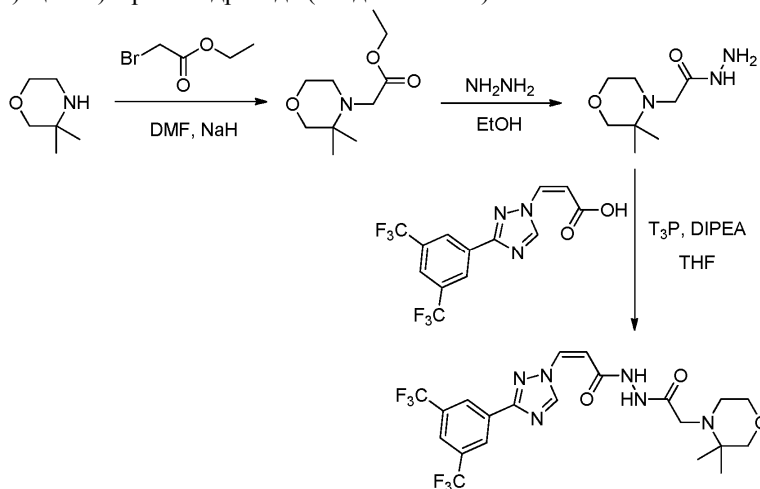
Синтез (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-(2-(3-оксоморфолино)ацетил)акрилогидрида



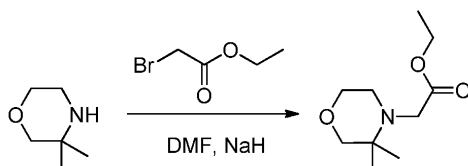
(Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акриловую кислоту (0,400 г, 1,14 ммоль) растворяли в THF (4 мл) и добавляли 2-(3-оксоморфолино)ацетогидрид (0,295 г, 1,71 ммоль). ТЗР (1,09 г, 1,71 ммоль) добавляли по каплям с последующим добавлением DIPEA (220,80 мг, 1,71 ммоль) при -60°C и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч. Реакционную смесь переносили в 25 мл ледяной воды и экстрагировали с помощью EtOAc (2×25 мл). Комбинированные органические слои отмывали концентрированным соевым раствором, высушивали на безводном сульфате натрия и концентрировали при отрицательном давлении для получения сырого продукта, который очищали путем хроматографии (0-4% MeOH/CH₂Cl₂) для получения 0,05 г (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-(2-(3-оксоморфолино)ацетил)акрилогидрида (выход: 8%).

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 10,33 (bs, 2H), 9,63 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,30 (s, 1H), 7,50-7,52 (d, J = 8 Гц, 1H), 6,01-6,03 (d, J = 8 Гц, 1H), 4,08-4,12 (m, 4H), 3,85-3,87 (m, 2H), 3,41-3,44 (m, 2H). ЖХ-МС m/z 507,13 $[M+H]^+$, t_R 1,950 мин.

Пример 15. Синтез (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-(2-(3,3-диметилморфолино)ацетил)акрилогидрида (соединения 15).

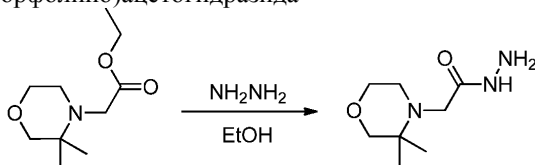


Синтез этил-2-(3,3-диметилморфолино)ацетата



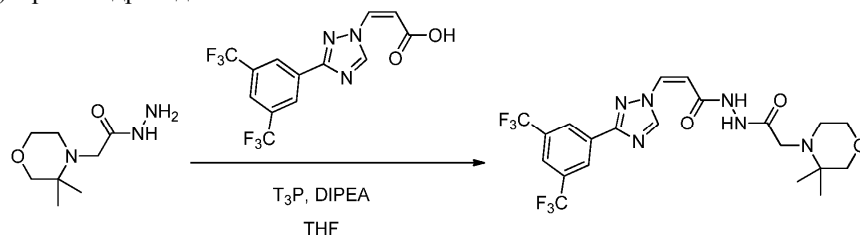
3,3-Диметилморфолин (1 г, 8,68 ммоль) растворяли в ацетонитриле (5 мл) и добавляли карбонат калия (1,8 г, 13 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин и добавляли этилбромацетат (1,1 мл, 9,55 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 60°C в течение 1 ч. Затем реакционную смесь переносили в 50 мл воды и экстрагировали с помощью этилацетата (3×50 мл). Комбинированные органические слои отмывали концентрированным соевым раствором, высушивали на безводном сульфате натрия и концентрировали при отрицательном давлении для получения сырого продукта, который применяли без дополнительной очистки в следующей стадии (выход сырого продукта: 91%). ЖХ-МС m/z 202,9 $[M+H]^+$, t_R 2,33 мин.

Синтез 2-(3,3-диметилморфолино)ацетогидразида



К раствору этил-2-(3-оксоморфолино)ацетата (600 мг, 2,98 ммоль) в этаноле (3 мл) добавляли гидрат гидразина (0,20 мл, 2,98 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь нагревали при 80°C в течение 1 ч, оставляли остывать до комнатной температуры, переносили в 50 мл воды и экстрагировали с помощью этилацетата (3×25 мл). Комбинированные органические слои отмывали концентрированным соевым раствором, высушивали на безводном сульфате натрия и концентрировали при отрицательном давлении для получения сырого продукта, который применяли без дополнительной очистки в следующей стадии (выход сырого продукта: 28%). ЖХ-МС m/z 188 $[M+H]^+$, t_R 188 мин.

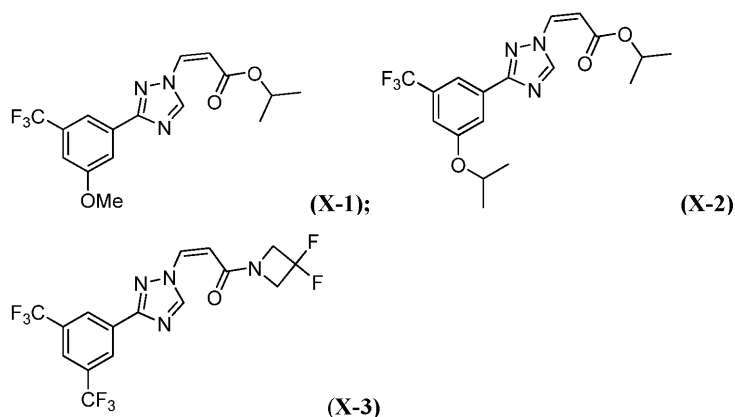
Синтез (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-(2-(3,3-диметилморфолино)ацетил)акрилогидразида



К раствору (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)акриловой кислоты (0,250 г, 0,7 ммоль) и 2-(3,3-диметилморфолино)ацетогидразида (0,160 г, 0,85 ммоль) в THF (2,5 мл) T₃P (0,63 мл, 1,06 ммоль) добавляли по каплям с последующим добавлением DIPEA (0,18 мл, 1,06 ммоль) при -60°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч, переносили в 25 мл ледяной воды и экстрагировали с помощью этилацетата (2×25 мл). Комбинированные органические слои отмывали концентрированным соевым раствором, высушивали на безводном сульфате натрия и концентрировали при отрицательном давлении для получения сырого продукта, который очищали путем хроматографии (0-4% MeOH:CH₂Cl₂) для получения 0,05 г (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-(2-(3,3-диметилморфолино)ацетил)акрилогидразида (выход: 13%).

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 10,55 (s, 1H), 9,81 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 8,56 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,49-7,51 (d, J = 10,4 Гц, 1H), 6,01-6,03 (d, J = 10,4 Гц, 1H), 3,65-3,67 (m, 2H), 3,30-3,34 (m, 2H), 3,08 (bs, 2H), 2,55-2,58 (m, 2H), 0,96 (s, 6H). ЖХ-МС m/z 521,18 $[M+H]^+$, t_R 1,937 мин.

Пример 16. Анализы. Определенные соединения согласно настоящему изобретению совместно с соединениями X-1, X-2 и X-3 (представленными ниже) исследовали в различных анализах.



Ингибирование ядерного экспорта.

Определяли ингибирование опосредованного CRM1 ядерного экспорта соединениями согласно настоящему изобретению. Результаты представлены в табл. 2. Ингибирующую активность соединений в отношении белка CRM1 определяли в анализе RevGFP. Соединения согласно настоящему изобретению являются активными в анализе Rev-GFP с $IC_{50} < 10$ мкМ, причем наиболее предпочтительные соединения характеризуются активностями со значениями IC_{50} , составляющими 1 мкМ.

Экспериментальный протокол: Rev представляет собой белок из вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1) и он содержит сигнал ядерного экспорта (NES) в своем С-концевом домене и сигнал ядерной локализации (NLS) в своем N-концевом домене. Ядерный экспорт белка Rev зависит от классического пути NES/ CRM1 (Neville et al., 1997, Kau et al., 2003). Накопление Rev в ядре наблюдают в клетках, обработанных такими специфическими ингибиторами CRM1, как LMB (Kau et al., 2003). В настоящем анализе клетки U2OS-RevGFP высеивают на черные 384-луночные планшеты с прозрачным дном за день до эксперимента. Соединения серийно разводят 1:2, начиная с 40 мкМ в отдельном 384-луночном планшете в DMEM, и затем переносят на клетки. Клетки инкубируют с соединением в течение ~1 ч перед фиксацией с помощью 3,7% формальдегида и ядра окрашивают с помощью Hoechst 33258. Измеряли количество GFP в клеточных ядрах и определяли IC_{50} соединений (Kau et al., 2003).

Анализ пролиферации клеток MTT.

Анализ клеточной пролиферации CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega) применяли на клетках MM1.S, Jurkat и HCT-116 для изучения цитотоксических и цитостатических свойств соединений. Анализ основан на расщеплении тетразолиевой соли, MTS, в присутствии электрон-связывающего реагента PES (феназинэтосульфата). Тетразолиевое соединение MTS биоредуцируется клетками в окрашенный продукт формазан, которые растворим в среде тканевой культуры. Это превращение преимущественно осуществляется NADPH или NADH, производимыми ферментами дегидрогеназами в метаболически активных клетках. Анализы проводят путем добавления небольшого количества реагента CellTiter 96® AQueous One Solution непосредственно в лунки с культурами, инкубируя в течение 1-4 ч и затем регистрируя поглощение при 490 нм с помощью спектрофотометра для прочтения 96-луночных планшетов. Поглощение выявило прямую корреляцию числа клеток и их метаболической активности. Клетки высевали с плотностью 5×10^3 - $1,5 \times 10^4$ клеток (в зависимости от типа клеток) в каждую лунку 96-луночного планшета в 100 мкл свежей культуральной среды и адгезивным клеткам давали возможность прикрепиться в течение ночи. Маточные растворы соединений разбавляли в среде культивирования клеток для получения восьми концентраций каждого лекарственного средства в диапазоне от 1 нМ до 30 мкМ и ДМСО в концентрации меньше чем 1% об./об. применяли в качестве отрицательного контроля. Через 72 ч обработки 20 мкл реагента CellTiter 96® AQueous добавляли в каждую лунку 96-луночных анализируемых планшетов и планшет инкубировали при 37°C в течение 1-4 ч в увлажненной атмосфере 5% CO₂. Затем поглощение каждой лунки регистрировали при 490 нм с помощью спектрофотометра для прочтения 96-луночных планшетов. В большинстве случаев анализ проводили в трех параллелях и результаты представляли в виде полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}), описанной ниже. Зависимость оптической плотности от концентрации соединения наносили на график и анализировали с применением уравнений нелинейной регрессии (Excel Fit) и рассчитывали IC_{50} для каждого соединения. Результаты представлены в табл. 2.

Определение фармакокинетических параметров (PK) и соотношения содержания в головном мозге к содержанию в плазме. Кровь собирали от мышей (N=3) для получения в общем 10 временных точек (перед введением дозы, 5 мин, 15 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 8 ч, 12 ч и 24 ч после введения дозы). Образцы крови получали от мышей на основе поочередности, причем каждая мышь давала 3 временных точки в сборе крови. В установленные моменты времени животным вводили анестезию с помощью изофлурана и приблизительно 110 мкл крови на каждую временную точку собирали посредством ретро-орбитального прокола в предварительно охлажденные пробирки с K₂EDTA (антикоагулянт). Образцы крови помещали на водный лед и центрифугировали (2000 g, 5 мин при 4°C) для получения плазмы не позднее 30 мин

после забора образца. Все образцы хранили замороженными при приблизительно -80°C до анализа. Перед анализом образцы смешивали с внутренним стандартом (дексаметазоном) в ацетонитриле, перемешивали вихревым способом, центрифугировали и супернатант аспирировали для анализа. Концентрацию соединений в плазме определяли с применением устройства для ЖХ-МС-МС (API 4000, Triple Quadrupole с ионизацией электрораспылением; колонка для сверхэффективной жидкостной хроматографии Ultra Performance Liquid Chromatography C18, с MeOH и муравьиной кислотой в качестве органических растворителей). Параметры РК, включая в себя без ограничения $T_{\max}$, $C_{\max}$, $t_{1/2}$, AUC_{last} , AU_{inf} рассчитывали с применением пакета программного обеспечения WinNonlin Professional 6.2, некомпартментной фармакокинетической модели NCA200.

Соотношение содержания в головном мозге к содержанию в плазме (В:Р). Отдельной группе мышей ($N=3$) вводили дозы (РО в концентрации 10 мг/кг, если не указано иное) и затем их умерщвляли во время максимальной концентрации в плазме (расчетное значение $T_{\max}$ составляет 2 ч после введения дозы), когда собирали терминальную плазму и головной мозг. Ткань головного мозга после забора промывали холодным солевым раствором, высушивали на фильтровальной бумаге, взвешивали и быстро замораживали путем помещения в сухой лед. Все образцы хранили замороженными при приблизительно -80°C до анализа. Во время анализа ткань головного мозга гомогенизировали (гомогенизирующий раствор PBS, pH 7,4), смешивали с внутренним стандартом (дексаметазоном) в ацетонитриле, перемешивали вихревым способом, центрифугировали и супернатант аспирировали для анализа концентрации соединения с применением методики для ЖХ-МС-МС (API 4000, Triple Quadrupole с ионизацией электрораспылением; колонка для сверхэффективной жидкостной хроматографии Ultra Performance Liquid Chromatography C18, с MeOH и муравьиной кислотой в качестве органических растворителей). Образцы плазмы обрабатывали идентичным способом (за исключением стадии гомогенизации) и концентрацию соединения в любом образце рассчитывали на основании созданных стандартных кривых. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты анализа соединений формулы I и их соединений сравнения

Соединение	Экспорт Rev [IC ₅₀]	Цитотоксичность [IC ₅₀]	AUC _{inf} (ч•нг/мл)*	В:Р*
X-1**	< 1 мкМ	< 1 мкМ	209‡	NT
X-2***	< 1 мкМ	< 1 мкМ	68,3†	1,27†
X-3	< 1 мкМ	< 1 мкМ	12300	5,0
1	NT	< 1 мкМ	33100	2,25
2	< 1 мкМ	< 1 мкМ	28900	0,16
3	< 1 мкМ	< 1 мкМ	15200	0,03
4	NT	< 1 мкМ	20929	0,028
5	NT	< 1 мкМ	NT	NT
6	NT	< 1 мкМ	NT	NT
7	NT	< 1 мкМ	NT	NT
8	NT	< 1 мкМ	9150	0,41
19	NT	< 1 мкМ	671****	N/A
10	NT	< 1 мкМ	NT	NT
11	NT	< 1 мкМ	8340	0,095
12	< 1 мкМ	< 1 мкМ	19600	0,06
13	NT	< 1 мкМ	1103	1,5
14	NT	< 1 мкМ	1419	0
15	NT	< 1 мкМ	588	0

* Вводили мышам в дозе 10 мг/кг перорально.

** Соединение 26 из US 2009/0275607.

*** Соединение 44 из US 2009/0275607.

**** Вводили мышам в дозе 5 мг/кг перорально.

‡ Значения AUC_{inf} для соединения X-1, вводимого мышам в дозе 10 мг/кг перорально, было ниже предела количественного определения. Данные, зарегистрированные для внутривенного введения (iv) 5 мг/кг.

† Вводили крысам в дозе 10 мг/кг перорально.

NT = не исследовали.

N/A= ниже предела количественного определения.

Значение AUC_{Inf} для соединения X-1 было ниже предела обнаружения, когда мышам вводили дозу 10 мг/кг перорально. Когда вводили дозу 5 мг/кг iv, соединение X-1 показало минимальное воздействие, на что указывало низкое значение AUC_{Inf} , составляющее 209 ч·нг/мл. Соотношение содержания в головном мозге к содержанию в плазме для соединения X-1 не определили вследствие его пренебрежимо малого содержания (ниже предела количественного определения) в головном мозге при введении дозы перорально.

Значение AUC_{Inf} для соединения X-2 по расчетам составило 68,3 ч·нг/мл при введении крысам в дозе 10 мг/кг перорально. Такие уровни воздействия являются чрезвычайно низкими по сравнению с соединением X-3 и соединениями формулы I согласно настоящему изобретению. Тем не менее, соединение X-2 проявляет умеренное соотношение содержания в головном мозге к содержанию в плазме. Низкое значение AUC_{Inf} , связанное с пренебрежимо малым соотношением содержания в головном мозге к содержанию в плазме, указывает на то, что соединение X-2 может преодолевать BBB, несмотря на низкие уровни воздействия. Авторы настоящего изобретения полагают, что соединение X-2 будет характеризоваться значительно более высоким соотношением содержания в головном мозге к содержанию в плазме, если его AUC_{Inf} увеличится.

Значение AUC_{Inf} для соединения X-3 по расчетам составило 12300 ч·нг/мл при введении крысам дозы 10 мг/кг перорально, указывая на хорошее воздействие. Тем не менее, X-3 продемонстрировало высокое соотношение В:Р, составляющее 5,0.

Все соединения формулы I показывают высокое значение AUC_{Inf} (>3500 ч·нг/мл) и относительно низкое соотношение В:Р (<2,5). Как правило, повышенные уровни воздействия терапевтического средства зачастую увеличивают вероятность проникновения в головной мозг. Следовательно, было удивительным и неожиданным, что соединения формулы I проявляют высокие значения AUC_{Inf} при относительно низких соотношениях содержания в головном мозге к содержанию в плазме.

Пример 17. Модели.

Оценка эффектов соединения 2 на рост опухоли в клеточной линии Z-138 лимфомы, выращенной в виде ксенотрансплантата у мышей SCID.

Лимфому Z-138 (№ ATCC CRL-3001) из клеток мантийной зоны получали из ATCC. Эти клетки выращивали в среде IMEM, дополненной 10% лошадиной сыворотки, 1% пенициллина и стрептомицина и 2 mM L-глутамин. Клетки субкультивировали путем разведения в соотношении 1:5-1:10. Использовали 24 самок мышей линии CB-17 SCID (код линии лаборатории Charles River 236), в возрасте 5-6 недель. Мышей линии SCID инокулировали в левую паховую область с помощью клеток Z-138 в объеме 0,2 мл, эквивалентном 4×10^7 клеток на каждую мышшь.

Лечение начинали, когда опухоли достигали среднего объема, составляющего 84,3 мм³. Мышей распределяли на четыре (4) группы по восемь (8) животных перед началом лечения на основании объема опухоли так, что средний объем опухоли в каждой группе находился в диапазоне от 77 до 92 мм³. Мыши получали лечение с помощью инертного носителя, стандартного лекарственного средства/лекарственного средства положительного контроля (циклофосамида) или соединения 2, как показано в табл. 3.

Таблица 3

Исходные группы исследования

Группа	Количество животных	Исследуемое средство	Доза	Путь введения	Схема
1	8	Инертный носитель	10 мл/кг	РО	ПСП
2	8	Циклофосамид	80 мг/кг	IP	Дни 1, 3, 5
3	8	Соединение 2	15 мг/кг	РО	ПСП
4	8	Соединение 2	7,5 мг/кг	РО	ПСП

Животных кормили кормом для грызунов Labdiet® 5001 и стерильной водой ad libitum. Опухоли измеряли один раз чрез день с помощью микроштангенциркуля и объем опухоли рассчитывали как (длина×ширина×ширина)/2. Всех животных взвешивали каждый день для оценки возможных различий в массе животных среди групп лечения в качестве показателя возможной токсичности в результате видов лечения. Животных с потерей массы тела, составляющей больше чем 20% от их исходной массы, подвергали эвтаназии. Мышей с потерей массы тела, составляющей больше чем 15% от их исходной массы, не подвергали лечению снова, пока потеря массы тела не восстанавливалась до меньше чем 5% от их исходной массы тела. Любые животные с объемом опухоли, составляющим больше чем 1500 мм³, подвергали эвтаназии.

Растворы дозировок готовили заново каждый день введения дозы. Соединение 2 предоставляли в виде лиофилизированного порошка, содержащего 69,61% соединения 2, доводя до 100% с помощью Pluronic F-68 и PVP K29/32. Его получали путем растворения лиофилизированного порошка в стерильной

воде. Циклофосфамид растворяли в концентрации 8 мг/мл в стерильной воде для инъекций. Все исследуемые средства вводили в объеме, составляющем 10 мл/кг массы тела.

Статистически значимые различия между группами лечения определяли с применением ранговой суммы Манна-Уитни или дисперсионных анализов с критическим значением, составляющим 0,05.

На фиг. 1 показано, что все группы лечения показывали статистически значимые снижения роста опухолей относительно инертного носителя при оценке путем сравнения площади под кривыми роста с применением дисперсионного анализа как для объема опухоли и объема опухоли в процентах. Указанные группы лечения показали значительное снижение роста опухоли при $p < 0,0001$. Некоторую потерю массы тела наблюдали в группе, получившей лечение с помощью соединения 2 в дозе 15 мг/кг и, несмотря на то, что она была статистически значимой по сравнению с контролями инертным носителем, тяжелая потеря массы тела была ограничена несколькими животными.

Соединение 2, введенное перорально, характеризовалось противоопухолевым эффектом как в дозе 7,5 мг/кг, так и 15 мг/кг дозозависимым образом.

Противоопухолевая активность соединения 2 в модели мелкоклеточной карциномы легких A549.

Клеточную линию A549 получали из культуры-экспланта карциномы альвеолярной ткани от 58-летнего мужчины европеоидной расы. Клетки выращивали в средах тканевых культур Хэма F12-K с 10% фетальной телячьей сыворотки и 1% пенициллина/стрептомицина. Клетки рутинно трипсинизировали и перевивали 1:10. 32 самки мышей CB-17 SCID (код линии лабораторий Charles River Labs 236), в возрасте 5-6 недель использовали со средней массой тела перед началом лечения, составляющим 16,3 г. Мышей делили на четыре (4) группы по восемь (8) животных перед началом лечения на основании объема опухоли. В день имплантации клетки отмывали в PBS, трипсинизировали и ресупсендировали в полных средах до плотности, составляющей 2×10^7 клеток/мл перед смешиванием с равным объемом матригеля. Указанную смесь затем инокулировали подкожно мышам в объеме, составляющем 0,1 мл с применением иглы калибра 23G.

Мышей лечили инертным носителем, стандартным лекарственным средством/лекарственным средством положительного контроля (цисплатином) или соединением 2, как показано в табл. 4. Животных взвешивали и их состояние регистрировали ежедневно и опухоли измеряли по понедельникам, средам и пятницам с помощью микроштангенциркуля, объем опухоли рассчитывали как (длина×ширина×ширина)/2.

Таблица 4

Исходные группы исследования

Группа	Количество животных	Исследуемое средство	Доза	Путь введения	Схема
1	8	Инертный носитель	10 мл/кг	РО	ПСП
2	8	Цисплатин	5 мг/кг	IP	Дни 1, 15
3	8	Соединение 2	10 мг/кг	РО	ПСП
4	8	Соединение 2	5 мг/кг	РО	ПСП

Животных с потерей массы тела, составляющей больше чем 20% от их исходной массы, подвергали эвтаназии. Мышей с потерей массы тела, составляющей больше чем 15% от их исходной массы, не подвергали лечению снова, пока потеря массы тела не восстанавливалась до меньше чем 5% от их исходной массы тела. Любые животные с объемом опухоли, составляющим больше чем 1500 мм³, подвергали эвтаназии.

Растворы дозировок готовили заново каждый день введения дозы. Соединение 2 предоставляли в виде лиофилизированного порошка, содержащего 69,61% соединения 2, доводя до 100% с помощью Pluronic F-68 и PVP K29/32. Его получали путем растворения лиофилизированного порошка в стерильной воде. Циклофосфамид растворяли в концентрации 8 мг/мл в стерильной воде для инъекций. Все исследуемые средства вводили в объеме, составляющем 0,1 мл/кг массы тела.

Статистически значимые различия между группами лечения определяли с применением ранговой суммы Манна-Уитни или дисперсионных анализов с критическим значением, составляющим 0,05.

Данные относительно изменения объема опухоли в ходе исследования показаны на фиг. 2. Средний объем опухоли для получавшей инертный носитель контрольной группы увеличился от 95 мм³ в 1 день до 1669 мм³ на 29 день. Группа, получившая лечение с помощью цисплатина, характеризовалась средним объемом опухоли, составляющим 104 мм³ в 1 день, увеличиваясь до 1136 мм³ на 29 день. Мыши, получившие лечение с помощью соединения 2 в дозе 10 мг/кг РО (группа 3) характеризовались средним объемом опухоли, составляющим 101 мм³ в 1 день, который увеличился до 686 мм³ к 29 дню. Мыши, получившие лечение с помощью соединения 2 в дозе 5 мг/кг РО (группа 6) характеризовались средним объемом опухоли, составляющим 101 мм³ в 1 день, который увеличился до 1231 мм³ к 29 дню.

Дополнительные анализы данных относительно объема опухоли проводили путем расчета средней площади под кривой (AUC) для каждой опухоли и сравнения групп с применением однофакторного дисперсионного анализа. Указанный анализ показал, что существовали статистически значимые различия между получившей инертный носитель контрольной группой и группой, получившей лечение с помо-

шью соединения 2 в дозе 10 мг/кг ($p=0,0005$). Следует отметить, что не наблюдалось статистически значимого снижения в росте опухоли в группе положительного контроля (цисплатин).

Соединение 2, вводимое перорально, характеризовалось противоопухолевым эффектом как в дозе 5 мг/кг, так и 10 мг/кг дозозависимым образом. Тем не менее, только получившая 10 мг/кг группа показала статистически значимое различие по сравнению с получившей лечение инертным носителем группой.

Оценка соединения 2 в индуцированной антиколлагеновым антителом мышинной модели ревматоидного артрита (CAIA).

Использовали двадцать четыре (24) самца мышей линии BALB/c в возрасте 6-8 недель. Разброс в массе животных во время начала лечения не превышал $\pm 20\%$ от средней массы. Животных случайным образом распределяли на 3 группы, которые будут получать инертный носитель, дексаметазон или соединение 2. На 0 день исследования (начало исследования), всех мышей подвергали воздействию 2 мг внутривенной инъекции коктейля антител ArthritoMAbTM (MD Biosciences #S1203001) с последующей интраперитонеальной инъекцией LPS (100 мкг/мышь) на 3 день исследования. Исследуемых животных лечили с помощью 7,5 мг/кг соединения 2 или 4 мг/кг соединения 2 перорально; 1 мг/кг дексаметазона интраперитонеально или инертного носителя перорально. Лечение вводили один раз в день в дни 4, 6, 8 и 10 для всех групп, за исключением тех случаев, когда применяли перерыв во введении доз. Если масса животного уменьшалась ниже 87% от его исходной массы в 0 день, животному не вводят дозу, пока оно не наберет массовый эквивалент до 90% или больше относительно своей массы в 0 день.

Развитие артрита, клинические признаки и показатели массы тела подвергали мониторингу у всех мышей в дни исследования 0, 3-8, 10 и 12. Наблюдения включали в себя изменения кожи, шерсти, глаз, слизистых оболочек, появление секретов и выделений (например, диареи) и автономную активность (например, слезотечение, слюноотделение, пилоэрекция, размер зрачка, необычный респираторный паттерн). Все лапы (переднюю левую и правую и заднюю левую и правую) каждого животного исследовали в отношении признаков артрита перед индукцией артрита и введением исследуемых соединений или контрольных соединений в 0 день исследования и впоследствии в дни исследования 3-8, 10 и 12 (окончание исследования). Определяли реакции артрита и их регистрировали согласно шкале 0-4 по возрастанию тяжести, как показано в табл. 5 ниже. Толщину лап также измеряли с применением циферблатного штангенциркуля (Kroeplin, Munich, Germany).

Таблица 5

Клинический показатель артрита

Показатель артрита	Степень
Нет реакции, нормальный	0
Слабое, но выраженное покраснение и отек голеностопного сустава/запястья или выраженное покраснение и отек, ограниченные отдельными пальцами, независимо от числа пораженных пальцев	1
От умеренного до тяжелого покраснение и отек голеностопного сустава/запястья	2
Покраснение и отек всей лапы, включая в себя пальцы	3
Максимально воспаленная конечность с вовлечением множественных суставов	4

Вводимую дозу рассчитывали на основании допущения, что животные весили, в среднем, 20 г. Маточный раствор дексаметазон получали в 100% этаноле и разбавляли до соответствующей концентрации в PBS перед применением. Инертный носитель для получающей инертный носитель контрольной группы получали путем растворения 0,6 г Pluronic и 0,6 г PVP в 100 мл дистиллированной деионизированной воды. Маточный раствор антитела (10 мг/мл) получали от MD Biosciences, Division of Morwell Diagnostics GmbH. LPS разбавляли PBS для достижения соответствующей концентрации. Тщательное перемешивание вихревым способом требовалось непосредственно перед его инъекцией. Соединение 2 получали в виде лиофилизированного порошка лекарственного средства, содержащего 70,71% соединения 2 с доведением до 100% с помощью Pluronic F-68 и PVP K29/32. Фиксированный объем, составляющий 200 мкл вводили каждой мыши.

Оценка, главным образом, была основана на средних значениях показателей артрита и измерениях толщины лап. В соответствующих случаях анализ данных с помощью дисперсионного анализа с апостериорным анализом Тьюки применяли для определения значимости эффектов лечения.

На фиг. 3А и 3В показаны результаты экспериментов на мышинной модели CAIA. Клинические признаки, связанные с введением LPS, развивались во всех группах после однократной дополнительной дозы LPS на 3 день. По сравнению с получившими лечение инертным носителем мышами мыши, получившие лечение с помощью 7,5 мг/кг или 4 мг/кг соединения 2 характеризовались значительно сниженными общими показателями артрита в 5-12 и 6-12 дни соответственно. Лечение дексаметазоном значительно снижало общий показатель артрита по сравнению с группой инертного носителя в 6-12 дни. По сравнению с получившими лечение инертным носителем мышами мыши, получившие лечение с помощью 7,5 мг/кг или 4 мг/кг соединения 2 характеризовались значительно сниженными показателями артрита задней лапы в 5-12 дни. Лечение дексаметазоном значительно снижало показатель артрита задней лапы по

сравнению с группой инертного носителя в 5 и 12 дни. Не наблюдали никаких значительных различий в массе тела между получившей лечение с помощью инертного носителя группой и получившими лечение с помощью исследуемых соединений группами.

Принимая во внимание данные настоящего исследования, соединение 2 в дозе 7,5 мг/кг или 4 мг/кг, вводимое перорально, проявляло значительную противоревматическую активность в индуцированной антиколлагеновым антителом модели ревматоидного артрита, с устойчивым снижением средних показателей артрита и снижением толщины лап.

Исследование эффективности соединения 2 при индуцированном коллагеном артритом (CIA) у крыс линии Lewis.

Сорок (40) самок крыс линии Lewis (BK), возрастом 6-8 недель с массой тела перед лечением в диапазоне 180-200 г делили случайным образом на четыре (4) группы (группы A-D) по десять (10) крыс в каждой. Крыс в группах B-D иммунизировали внутрикожно бычьим СП в IFA в трех местах вблизи основания хвоста и нанося на спину 500 мкл эмульсии в день 0 (200 мкл, 200 мкл, 100 мкл на каждый участок). На 7 день крысам в группах B-D вводили бустерные инъекции с таким же количеством эмульсии внутрикожно вблизи вышеуказанных участков инъекции. В модели терапевтического лечения (группы C и D) дексаметазон или соединение 2 перорально вводили крысам с CIA после появления артрита, как показано в табл. 6. Крыс взвешивали каждый день и перерыв во введении лекарственного средства делали для животного, когда потеря массы тела составляла больше чем 13%.

Таблица 6

Исходные группы исследования

Группа	Иммунизация	Лечение		Введение	количество
A	Нативные	PBS	инертный носитель	PO. QD, от появления до дня 28	10
B	Модель	коллаген II в IFA	инертный носитель	PO. QD, от появления до дня 28	10
C	DEX (1 МПК)	коллаген II в IFA	DEX (1 МПК)	PO. QD, от появления до дня 28	10
D	Соединение 2 (4 МПК)	коллаген II в IFA	соединение 2 (4 МПК)	PO. QD, от появления до дня 28	10

Развитие CIA оценивали посредством макроскопических показателей и измерений отека лап. Эти показатели оценивали каждый день в течение первых 5 дней после сенсибилизации (7 день) и затем дважды в неделю (понедельник и четверг) в течение оставшегося времени с помощью системы определения клинических показателей для каждой лапы, показанной в табл. 7.

Таблица 7

Клинические показатели артрита

Показатель артрита	Степень
Нет видимой эритемы и отека	0
Эритема и отек, относящиеся к среднему отделу стопы (предплюсны) или голеностопному суставу	1
Эритема и слабый отек, продолжающиеся от голеностопного сустава к предплюсне	2
Эритема и умеренный отек, продолжающиеся от голеностопного сустава к плюсне	3
Эритема и тяжелый отек охватывают голеностопный сустав, стопу и пальцы	4

Объем стопы измеряли путем плетизмометрии в тот же день, что и измерения показателей артрита в течение всего периода исследования. Объем каждой задней лапы и степень отека измеряли и применяли следующее уравнение:

$$\text{Степень отека} = (C_N - C_0) / C_0 \times 100\%.$$

На фиг. 4А представлен график зависимости отека сустава от времени и на нем показан отек сустава, измеренный по шкале 0-4 у нативных крыс и крыс, получивших лечение согласно модели с помощью положительного контроля или соединения 2.

Бычий СП (в 10 mM уксусной кислоты) в дозе 4 мг/мл эмульгировали с равным объемом IFA.

Клинический показатель суммировали для каждого животного и общее среднее значение для всех животных в каждой группе выражали как средний показатель артрита. На фиг. 4В представлен график зависимости клинических показателей от времени, и на нем показаны клинические показатели артрита нативных крыс и крыс, получивших лечение согласно модели с помощью положительного контроля или соединения 2.

На 28 день исследования трех репрезентативных животных из каждой группы лечения подвергали эвтаназии и задние лапы собирали и хранили в 4% нейтрального забуференного формалина. Полученные срезы задних лап подвергали окрашиванию гематоксилином и эозином (H&E).

Гистопатологический анализ контрольных животных показал эрозию хряща и формирование по-

верхностного диффузного сосудистого кератита наряду с развитием заболевания. Тем не менее, у получивших лечение с помощью соединения 2 крысы обнаружили относительно интактный хрящ на поверхности сустава, и формирование поверхностного диффузного сосудистого кератита было минимальным. Результаты гистологического анализа показаны на фиг. 5.

Данные относительно клинических показателей, отека сустава и гистологического исследования демонстрируют корреляции. Результаты также показали терапевтическую эффективность соединения 2 в дозе 4 мг/кг (МРК), что продемонстрировано его эффектами на клинические показатели, показатели отека сустава и гистологическое исследование. Результаты модели CIA у крыс линии Lewis отображены на фиг. 4А и 4В и фиг. 5.

Противопсориазная активность соединения 2 при индуцированном форбол-12-миристат-13-ацетатом (РМА) псориазе у самок мышей линии BALB/c.

Использовали двадцать четыре (24) самки мышей линии BALB/c, возрастом 6 -8 недель с массой, составляющей от 22 до 30 г. Мышей рандомизировали на четыре (4) группы по восемь (8) мышей в каждой. Распределение животных по группам было следующим: группа I (нативные; этанол), группа II (РМА; этанол), группа III (РМА; соединение 2 10 мкМ) и группа IV (РМА; бетаметазон). Двадцать (20) мкл РМА (4 мкг/20 мкл ацетона) наносили местно на верхнюю поверхность ушной раковины всех животных в группе II - группе IV. РМА наносили ежедневно на левое ухо и через день (понедельник-среды-пятница) на правое ухо с 1 дня по 9 день. Через 30 мин после нанесения РМА инертный носитель или стандартное соединение (бетаметазон) или соединение 2 наносили местно на уши животных из различных групп. Следует отметить, инертный носитель, стандартное соединение и соединение 2 наносили ежедневно на оба уха различных животных с 1 дня по 12 день.

За животными наблюдали ежедневно в течение периода, составляющего 12 дней, в отношении любых связанных с лечением симптомов. Исходную толщину уха регистрировали у всех животных (перед нанесением РМА) с применением цифрового резбмера во время T0 (1 день). В течение всей продолжительности исследования через 4 ч после нанесения инертного носителя, стандартного соединения или соединения 2 толщину ушей измеряли ежедневно с применением цифрового резбмера и регистрировали показатели эритемы, образование налета и складок. Тяжесть повреждения ушной раковины оценивали с помощью систем оценки, показанной в табл. 8.

Таблица 8

Показатели псориаза				
Параметр/Показатель	0	1	2	3
Эритема	Нормальный	Слабый	Умеренный	Тяжелый
Образование налета				
Образование складок				

Животные получали сбалансированный по питательным веществам автоклавированный пеллетированный корм (Nutrivet Life Sciences, Pune (India)) ad libitum и имели доступ к нормальной питьевой воде в течение всех периодов эксперимента.

Коммерчески доступный 100% ДМСО (квалификации LR (лабораторный реагент)) и этанол (квалификации LR) использовали для получения составов. РМА получали путем растворения 10 мг РМА в 50,0 мл ацетона. Соединение 2 получали путем растворения 1,47 мг соединения 2 в 300 мкл 100% ДМСО.

Результаты экспериментов представлены на фиг. 6А-6D как среднее $\pm$ SEM. Не наблюдали значительного различия между всеми группами лечения в отношении массы тела, потреблении пищи и воды. Нанесение РМА показало, что (i) толщина левого, а также правого уха увеличилась (группа II по сравнению с нативными животными) и (ii) индекс активности болезни (DAI) левого, а также правого уха увеличился (группа II по сравнению с нативными животными). Важно отметить, что местное нанесение соединения 2 приводило к выраженному снижению индуцированного РМА увеличения (i) толщины левого и правого уха и (ii) DAI левого и правого уха. Указанный эффект был выраженным в 6-8 дни исследования, когда большее число животных, получивших лечение с помощью соединения 2, характеризовались сниженной толщиной левого/правого уха (по сравнению с животными из группы II), и DAI (по сравнению с животными из группы II). Следует отметить, что опосредованное соединением 2 снижение индуцированного РМА увеличения толщины левого/правого уха и DAI уменьшается по ходу исследования (10 день и далее).

В индуцированной РМА модели псориаза у мышей соединение 2 проявило статистически значимую противопсориазную активность.

Противопсориазная активность соединения 2 в модели индуцированного имиквимодом (IMQ) дермального воспаления/псориаза (исследование 1).

Использовали сорок (40) самцов мышей линии BALB/c возрастом 6-8 недель с массой тела перед лечением, составляющей 22-30 г. Мышей линии BALB/c рандомизировали на четыре (4) группы по 10 мышей на группу. Небольшой участок (приблизительно 2x2 см²) кожи на спине всех животных аккуратно выбривали. Животные группы I служили в качестве нативных животных. Псориаз индуцировали в группах II-IV [группа II (IMQ; инертный носитель), группа III (IMQ; соединение 2 (1 мкМ)) и группа IV

(IMQ; циклофосфамид (10 мг/кг)] путем местного нанесения 31,25 мг крема IMQ ежедневно на спину животных с 1 дня по 13 день. Через 4 ч после нанесения IMQ вводили инертный носитель, или стандартное соединение (циклофосфамид), или соединение 2 (местно - 30 мкл; перорально - согласно массе тела) соответствующей группе с 1 дня до 13 дня ежедневно. Через 2 ч после введения инертного носителя, или стандартного соединения, или соединения 2 эритему, образование налета, образование складок и утолщение кожи регистрировали для определения индекса активности болезни (DAI).

За животными наблюдали ежедневно в течение периода, составляющего 13 дней в отношении любых связанных с лечением симптомов. Ежедневные наблюдения включали в себя массу тела, потребление пищи, утолщение кожи, образование налета, образование складок, эритему, выделения из носа, движение, дыхание, волосяной покров, вздутый живот, состояние кожи, шерсть, слизистую оболочку, присутствие или отсутствие секретов, состояние глаз, подъем хвоста, двигательную активность, позу и походку. Тяжесть повреждения дорсальной части кожи оценивали путем присвоения баллов показателям эритемы, образования налета, образования складок и утолщения кожи на основании внешних наблюдений за кожей согласно заголовкам в табл. 9.

Таблица 9

Показатели псориаза				
Параметр/Показатель	0	1	2	3
Эритема	Нормальный	Слабый	Умеренный	Тяжелый
Образование налета				
Образование складок				
Утолщение кожи				

Коммерчески доступный 100% ДМСО (квалификации LR), этанол (квалификации LR), циклофосфамид (СМС), PVP и Pluronic использовали для получения составов. Соединение 2 получали путем растворения 1,47 мг соединения 2 в 300 мкл 100% ДМСО. Циклофосфамид получали путем растворения 500 мг СМС в 100 мл дистиллированной воды.

Результаты эксперимента, показанные на фиг. 7А и 7В, выражают как среднее $\pm$ SEM.

Не обнаружили никакого значительного различия в массе тела, потреблении пищи и воды в группе лечения по сравнению с контрольной группой в течение исследования. Соединение 2 уменьшало проявление индуцированного IMQ заболевания.

Соединение 2 показывает противопсориазическую активность, что подтверждается снижением индекса активности болезни по сравнению с получившей лечение инертным носителем группой. Кроме того, соединение 2 вызывало указанный эффект без негативного неблагоприятного воздействия на массу тела, потребление пищи и воды.

Противопсориазная активность соединения 2 в модели индуцированного имиквимодом (IMQ) дермального воспаления/псориаза (исследование 2).

Сорок (40) самцов мышей линии BALB/c (Biological E Limited, Hyderabad (регистрационный номер CPCSEA: 36/99/CPCSEA)) делили на четыре (4) группы, состоящих из десяти (10) мышей каждая. Животных рандомизировали на основании их массы тела. Группы обозначали как группа I (нативная), группа II (IMQ; инертный носитель (PEG 400 и HPBCD)), группа III (IMQ; соединение 2 (2,5 мг/кг)) и группа IV (IMQ; циклофосфамид (10 мг/кг)).

Небольшой участок на спине каждой мыши сбрасывали, убеждаясь что указанные участки равны по размеру/площади. Псориаз индуцировали в группах II-IV путем местного нанесения 50 мг крема IMQ ежедневно с 1 дня по 6 день на спину животных. В 1 день и 2 день исследования через 4 ч после местного нанесения IMQ соединение 2, или положительный контроль (циклофосфамид), или инертный носитель вводили животным в соответствующих группах. Следует отметить, что животных в группе II и группе III подвергали воздействию подкожных инъекций, тогда как животные в группе IV получали пероральное введение. Лечение соединением 2, инертным носителем и циклофосфамидом заканчивали на 2 день. Указанные группы животных продолжали получать ежедневную обработку IMQ до 6 дня. На 7 день животных с индуцированным псориазом повторно рандомизировали на 3 группы, состоящие из 10 животных каждая, на основании кумулятивного индекса активности болезни (CDAI). С 7 дня до 9 дня животные получали инертный носитель, или положительный контроль, или соединение 2. Следует отметить, что к этим дням животные не получали обработку с помощью IMQ. С 10 дня по 14 день животных лечили альтернативно с помощью IMQ (дни 10, 12 и 14) или инертным носителем, положительным контролем или соединением 2 (дни 11, 13).

За всеми животными наблюдали ежедневно в течение периода, составляющего 16 дней в отношении макроскопических наблюдений, массы тела и потребления пищи и воды. В дни 1 и 2 показатели эритемы, образования налета, образования складок и утолщения кожи регистрировали через 2 ч после введения инертного носителя/положительного контроля/исследуемых соединений, и в дни 3-14 показатели регистрировали через 4 ч после нанесения IMQ или введения положительного контроля, инертного носителя или соединения 2. Тяжесть индукции поражения на спине животных оценивали и присваивали баллы, как показано в табл. 10.

Инертный носитель получали путем растворения 40 мг HPBCD в 70,0 мл дистиллированной воды. Соединение 2 получали путем растворения 3,59 мг в 0,5% PVP и 0,5% Pluronic. Циклофосфамид получали путем растворения 500 мг СМС в 100 мл дистиллированной воды.

Результаты эксперимента, показанные в табл. 10, выражают как среднее $\pm$ SEM. Данные оценивали с применением однофакторного дисперсионного анализа, и апостериорный анализ проводили с применением критерия Дуннетта.

Таблица 10

Коэффициент снижения индекса активности болезни (DAI)

Коэффициент снижения DAI		Показатели перед введением ИМО/лекарственного средства % изменения от введения 1 дозы (т.е. от показателей перед введением ИМО /лекарственного средства на 7 день)									
		День 7	День 8	День 9	День 10	День 11	День 12	День 13	День 14	День 15	
Нативные, инертный носитель		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ИМО, инертный носитель		0.0	4.2	-33.3	-66.7	-60.4	-54.2	-45.8	-43.8	-43.8	
ИМО, соединение 2		0.0	-33.8	-58.8	-88.2	-73.5	-80.9	-61.8	-66.2	-64.7	
ИМО, циклофосфамид		0.0	16.3	-39.5	-79.1	-25.6	-39.5	-25.6	-34.9	-41.9	
		Показатели через 4 часа после введения ИМО/лекарственного средства % изменения от введения 1 дозы (т.е. от показателей перед введением ИМО /лекарственного средства на 7 день)									
		День 7	День 8	День 9	День 10	День 11	День 12	День 13	День 14		
Нативные, инертный носитель		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
ИМО, инертный носитель		4.2	8.3	-35.4	-70.8	-58.3	-52.1	-39.6	-41.7		
ИМО, соединение 2		-30.9	-35.3	-63.2	-88.2	-70.6	-73.5	-60.3	-63.2		
ИМО, циклофосфамид		23.3	20.9	-41.9	-86.0	-25.6	-34.9	-32.6	-32.6		

Наблюдали, что коэффициент снижения индекса активности болезни у животных, получивших лечение с помощью соединения 2, был значительно выше, чем у коэффициента, наблюдаемого у животных, получивших лечение с помощью инертного носителя. Не наблюдали никакого значительного различия в массе тела, потреблении пищи и воды в группе лечения по сравнению с контрольной группой во время исследования.

Полученные результаты показывают, что лечение с помощью соединения 2 уменьшало проявление индуцированного ИМО заболевания, не оказывая существенного влияния на потребление пищи или воды, и, тем самым, не демонстрируя какой-либо эффект на массу тела животных в получивших лечение группах.

Эффект соединения 2 у крыс линии Zucker.

Двадцать одного (21) самца линии Zucker крысы возрастом 7 месяцев распределяли в 3 группы по N=7 на основании эквивалентных показателей массы тела и потребления пищи. Дополнительную группу по N=7 совпадающих по возрасту не страдающих ожирением контрольных животных линии Zucker включали в качестве контроля. Массы тела и потребление пищи и воды измеряли приблизительно в одно и то же время каждый день (14:30-15:30 ч). В дни лечения вводили в 14:30-15:30 (приблизительно за 2 ч до выключения света).

Страдающие ожирением и не страдающие ожирением контрольные животные линии Zucker перорально получали лечение с помощью инертного носителя (объем дозы 10 мл/кг; 0,5% Pluronic F68 и 0,5% PVP K29/32 в воде) каждый рабочий день. Обе группы соединения 2 (1,5 мг/кг и 3 мг/кг) перорально получали лечение каждый рабочий день (объем дозы 10 мл/кг; 0,5% Pluronic F68 и 0,5% PVP K29/32 в воде). Перед фазой лечения собирали исходные данные в течение 4 дней. Фаза лечения продолжалась в течение 16 дней, а также была включена отмывочная фаза, составляющая 6 дней.

На фиг. 8A и 8B и 9 показаны эффекты соединения 2 на крыс линии Zucker. В исходной фазе не наблюдали никакого значительного различия в массе тела и ежедневном потреблении пищи между 3 группами страдающих ожирением животных линии Zucker. Тем не менее, все группы значительно отличались от не страдающей ожирением группы линии Zucker.

Соединение 2 (1,5-3 мг/кг перорально) производило дозозависимое снижение ежедневного потребления пищи и массы тела в течение 16-дневного периода лечения по сравнению с контрольной группой линии Zucker. Лечение с помощью соединения 2 также значительно увеличивало потребление воды, измеренное в течение того же периода. Обнаружили значительное различие в наборе массы тела между получившей 3 мг/кг соединения 2 группой и получившей инертный носитель группой линии Zucker. Не обнаружили значительного различия в наборе массы между получившей лечение с помощью 1,5 мг/кг соединения 2 группой и получившей инертный носитель группой линии Zucker.

Соединение 2 показало дозозависимое снижение в ежедневном потреблении пищи, при этом повышенная доза (3 мг/кг) была более эффективной, чем доза, составляющая 1,5 мг/кг. Кроме того, получившая соединение 2 в дозе 3 мг/кг группа показала набор массы по сравнению с контрольной группой линии Zucker.

Эффект соединения 2 в модели индуцированного рационом ожирения.

Самцов крыс линии Sprague-Dawley в возрасте 2 месяцев помещали на рацион с высоким содержанием жиров (Research Diets Inc., код продукта D12492, 60% ккал.% жира) в течение 3 месяцев. Группу совпадающих по возрасту крыс кормили нормальным кормом для лабораторных животных (LabDiet

5001, ~13% ккал.% жира), указанные животные служили в качестве контроля для группы DIO.

В возрасте 4 месяцев и 2 месяцев для крыс, находящихся на рационе с высоким содержанием жиров, всех крыс распределяли на 3 группы по N=7 на основании эквивалентных показателей массы тела и потребления пищи. Показатели массы тела и потребления воды и пищи измеряли приблизительно в одно и то же время каждый день. В дни лечения дозы вводили приблизительно за 2 ч до выключения света.

Контрольная группа DIO получала лечение с помощью инертного носителя (перорально, объем дозы 10 мл/кг; 0,5% Pluronic F68 и 0,5% PVP K29/32 в воде) каждый рабочий день. Получающая соединение 2 в дозе 1,5 мг/кг группа перорально получала лечение каждый рабочий день в течение фазы лечения (объем дозы 10 мл/кг; 0,5% Pluronic F68 и 0,5% PVP K29/32 в воде). Получающая соединение 2 в дозе 3 мг/кг группа (объем дозы 10 мл/кг; 0,5% Pluronic F68 и 0,5% PVP K29/32 в воде) перорально получала лечение вначале один раз ежедневно каждый рабочий день в течение 1 недели, затем дважды в неделю (понедельник, среда) в течение 2 недель. В недели лечения 3 и 4 лечение соединением 2 в дозе 3 мг/кг продолжали дважды в неделю, за исключением того, что дозировку вводили в понедельник и четверг.

Перед фазой лечения в течение 3 дней собирали исходные данные. Фаза лечения длилась в течение 4 недель. Также включали отмывочную фазу в течение 10 дней.

Соединение 2 поставляли в форме порошка. Исследуемое соединение характеризовалось процентным отношением активного вещества, составляющим 65,89%. Процентное отношение активного вещества регулировали с применением BEW, составляющим 1,437 и получали путем растворения в растворе инертного носителя 0,5% мас./об. Pluronic F-68 и 0,5% мас./об. PVP K-29-32. Раствор инертный носитель получали каждую неделю, тогда как свежеприготовленное соединение 2 получали каждые 2 дня и хранили при +4°C. Животным вводили дозы в объеме, составляющем 10 мл/кг. Отдельные дозы рассчитывали на основании последних показателей массы тела для обеспечения правильной дозировки мг/кг/день.

На фиг. 10А и 10В и 11 показаны эффекты соединения 2 в модели индуцированного рационом ожирения. В исходной фазе не наблюдали никакого значительного различия в массе тела и ежедневном потреблении пищи и воды между 3 группами DIO. Тем не менее, все группы DIO значительно отличались от группы с обычным рационом. В частности, животные, которых кормили обычным рационом, характеризовались значительно меньшей массой тела относительно крыс, которых кормили рационом с высоким содержанием жиров. Напротив, крысы, которых кормили рационом с высоким содержанием жиров, потребляли ежедневно значительно меньше пищи и воды относительно крыс на обычном рационе.

Соединение 2 (1,5-3 мг/кг перорально) производило дозозависимое снижение ежедневного потребления пищи и масса тела в течение 28-дневного периода лечения по сравнению с контрольной группой DIO. Лечение с помощью соединения 2 также значительно увеличивало потребление воды, измеренное в течение того же периода ($F_{3,27} = 11,2$, $P < 0,01$).

В отношении эффекта лечения на набор массы тела его формально измеряли в виде процентного отношения изменения массы тела, начиная с 3 дня исследования. Наблюдалось значительное снижение в наборе массы в обеих получивших соединение 2 группах по сравнению с DIO контролями через 7 дней лечения (10 день исследования) и 14 дней лечения (17 день исследования).

Массу тела, потребление пищи/воды измеряли ежедневно в течение отмывочной фазы. Потребление пищи в получивших соединение 2 группах было аналогично контролям DIO. Масса тела в получивших соединение 2 группах оставалась ниже, чем в контролях DIO.

Соединение 2 снижало ежедневное потребление пищи дозозависимым образом. Соединение 2 также воздействует на набор массы тела как в дозе, составляющей 1,5 мг/кг, так и 3 мг/кг.

Индукция противовоспалительного пути Nr2 соединением 1.

Клетки THP-1 (клетки острого моноцитарного лейкоза человека) использовали для оценки эффектов соединения 1 на путь Nrf2 в воспалительном окружении. Ядерный фактор (родственный эритроидному фактору 2) 2 (Nrf2) представляет собой противовоспалительный транскрипционный фактор. При нормальных условиях Nrf2 удерживается в цитоплазме с помощью чашеподобного ECH-ассоциированного белка 1 (KEAP1), который расщепляет Nrf2 путем убиквитинилирования. Nrf2 также может проникать в ядро и обратно в цитоплазму в виде транспортируемого CRM1 соединения. В настоящем исследовании Nrf2 защищали от расщепления путем нокдауна KEAP1 с помощью миРНК. Затем истощенные по KEAP1 клетки обрабатывали TNF α для индукции воспаления и исследовали способность соединения 1 предотвращать воспаление путем положительной регуляции пути Nrf2. Для демонстрации активации пути Nrf2 экспрессию двух нижележащих генов NAD(P)H дегидрогеназы [хинон] 1 (NQO1) и эпоксидгидролазы 1 (EPHX1) определяли с помощью количественной ПЦР.

Клетки THP-1 (острого моноцитарного лейкоза) помещали в две 10 см чашки для культивирования (6×10^6 клеток/чашка) со средой RPMI-1640 (Lonza), дополненной 10% термически инактивированной фетальной бычьей сывороткой (Invitrogen) и 2-меркаптоэтанолом до конечной концентрации, составляющей 0,05 mM. Клетки в одной чашке трансфектировали с помощью 50 нМ миРНК KEAP1 (Life Technologies, Silencer Select, регистрационный номер миРНК s18982) с применением липофетамина RNAiMax (Invitrogen), тогда как клетки в другой чашке трансфектировали с помощью 50 нМ контрольной миРНК, Block-iT (Invitrogen). Трансфектированные клетки оставляли на 72 ч и эффективность нокдауна KEAP1

рассчитывали с помощью количественной ПЦР с применением зонда к KEAP1.

Далее клетки из каждой чашки делили поровну на 4 планшета в различных 6-луночных планшетах. Одну из лунок из каждого планшета предварительно обрабатывали 1 мкМ соединения 1 в течение 1 ч с последующим добавлением 20 нг/мл TNF α в течение 24 ч. Другие лунки обрабатывали или 1 мкМ соединения 1, или 20 нг/мл TNF α , или ничем в течение 24 ч. После обработки РНК экстрагировали из клеток с применением набора для экстракции РНК (Qiagen). Образцы РНК из каждой группы обработки обратно транскрибировали и проводили ПЦР в реальном времени на соответствующих последовательностях кДНК с применением зондов к Nrf2 и двум его нижележащим генам, NQO1 и EPHX1. Клетки THP-1 трансфектировали с помощью миРНК KEAP1. Достигали 40% эффективность нокдауна. Клетки с нокдауном KEAP1 обрабатывали с помощью или 1 мкМ соединения 1, или 20 нг/мл TNF α , или и тем и другим в течение 24 ч.

На фиг. 12А показано 2,5-кратное увеличение экспрессии Nrf2 в клетках, обработанных комбинацией TNF α и соединения 1, по сравнению с необработанными клетками. Однако аналогичное (до 3-кратного) увеличение содержания мРНК Nrf2 также обнаружили в клетках, обработанных соединением 1 и TNF α , без нокдауна KEAP1. Соединение 1 или TNF α отдельно не оказывало какой-либо значительный эффект на экспрессию Nrf2 с нокдауном KEAP1 или без него.

На фиг. 12В показана экспрессия NAD(P)H дегидрогеназы [хинона] 1 или NQO1 в клетках с нокдауном KEAP1 или без него. На фиг. 12В показано, что нокдаун KEAP1 характеризовался эффектом на экспрессию NQO1. Даже образец без какой-либо обработки показывал 2-кратное увеличение содержания в нем мРНК при нокдауне KEAP1. Комбинация соединения 1 и TNF α приводила к 4-кратному увеличению экспрессии NQO1 для образца с нокдауном KEAP1 по сравнению с 2-кратным увеличением, наблюдаемым с применением той же комбинации в клетках без нокдауна KEAP1.

На фиг. 12С показано содержание мРНК эпоксидгидролазы 1 или EPHX1 в клетках с нокдауном KEAP1 или без него после обработки соединением 1 и/или TNF α . На фиг. 12С показано, что соединение 1 положительно регулирует экспрессию EPHX1 в присутствии или при отсутствии TNF α . Нокдаун KEAP1 увеличивал эффект соединения 1, поскольку индукцию вплоть до 2,5-кратной наблюдали в образцах с соединением 1 и нокдауном KEAP1.

Обработка с помощью 1 мкМ соединения 1 в течение 24 ч в присутствии 20 нг/мл TNF α положительно регулировала передачу сигнала Nrf2. Нокдаун KEAP1 усиливал указанный эффект, что наблюдалось в повышенной кратности индукции NQO1 (4- в отличие от 2-кратной) и EPHX1 (2,5- в отличие от 1,5-кратной) по отношению к их уровням экспрессии без нокдауна KEAP1. Результаты показывают, что ингибирование CRM1 может активировать путь Nrf2 во время воспаления, и указывают на то, что лечение с помощью соединения 1 в комбинации с ингибиторами KEAP1 может быть более эффективным, чем лечение с помощью соединения 1 отдельно.

Эффекты соединений 1, 2 и 12 на транскрипционную активность NF- κ B.

TNF α может индуцировать транскрипционную активность NF- κ B. Указанная транскрипционная активность инициируется, когда I κ B, который связывается с NF κ B и ингибирует его активность, расщепляется. Затем представитель семейства белков NF- κ B класса II, RelA или p65, который образует гетеродимер с представителем семейства класса I, p50, перемещается в ядро. Субъединица p65 содержит трансактивационный домен на своем С-конце, который активирует транскрипцию связанных с воспалением генов. Подобно NF- κ B I κ B также может перемещаться в клеточное ядро. Накопление в ядре I κ B защищает белок от расщепления, поскольку расщепление происходит, в основном, в цитоплазме. CRM1 отвечает за ядерный экспорт I κ B. Следовательно, блокирование ядерного экспорта I κ B посредством ингибирования CRM1 минимизирует активность NF- κ B, так как ядерный I κ B связывает NF- κ B и предотвращает связывание NF- κ B с последовательностями ДНК.

Соединения исследовали на клетках HeLa (клетках аденокарцинома) для количественного определения их способности ингибировать транскрипционную активность NF- κ B. Активность NF- κ B индуцировали в клетках HeLa с помощью TNF α и затем соединения добавляли для ингибирования индуцированной активности NF- κ B. Полумаксимальные ингибирующие концентрации (IC₅₀) некоторых соединений, а именно соединения 1, соединения 2 и соединения 12, определяли в исследованиях зависимости от дозы.

Клетки HeLa помещали в 12-луночный планшет (200000 клеток/лунка) и культивировали в минимальной питательной среде Игла (EMEM) от Lonza, дополненной 10% термически инактивированной фетальной бычьей сывороткой (Invitrogen) и 50 мкг/мл пенициллина/стрептомицина (Invitrogen), и оставляли в течение ночи для прикрепления. Клетки повторно обрабатывали с помощью серийно разбавленных (начиная с 30 мкМ; разведение 1:3) соединений в течение 1 ч и затем, подвергая воздействию 20 нг/мл TNF α (Peprotech), в течение 4 ч в бессывороточных средах. После обработки клетки отмывали с помощью PBS (Invitrogen) и лизировали с помощью буфера RIPA (Thermo Scientific). Транскрипционную активность NF- κ B в клетках измеряли с помощью набора для хемилюминисцентного анализа транскрипционного фактора (№ по каталогу Thermo Scientific 89859) согласно инструкциям производителя. Крат-

ко, 1,5 мг/мл RIPA лизированного цельноклеточного экстракта из каждой обработки инкубировали в 96-луночном планшете, связанном с биотинилированной консенсусной последовательностью NF-κB. Активный транскрипционный фактор NF-κB, связанный с консенсусной последовательностью, инкубировали с первичным антителом p65 NF-κB и затем с вторичным конъюгированным с HRP антителом. Хемилюминесцентное вещество добавляли к лункам и полученный сигнал обнаруживали с применением люминометра. Три отдельных эксперимента анализировали для каждой концентрации кривых IC₅₀. Модель 205 XLfit применяли для расчета кривых IC₅₀.

Ингибирование транскрипционной активности NF-κB измеряли путем серийных разведений соединения 1, соединения 2 и соединения 12 через 1 ч после обработки соединением с последующим воздействием в течение 4 ч 20 нг/мл TNFα. Три независимых эксперимента провели для каждой концентрации, представляя в настоящем документе средние значения. Соединение 1 характеризовалось значением IC₅₀, составляющим 1,59 мкМ, соединение 2 значением IC₅₀, составляющим 1,22 мкМ, и соединение 12 значением IC₅₀, составляющим 1,46 мкМ.

Оценка эффектов соединения 1 на экспрессию провоспалительного белка COX-2 в клетках HeLa, выращенных *in vitro*.

Клетки HeLa помещают в 6-луночную чашку для культивирования ($2,5 \times 10^5$ клеток/лунка) со средой EMEM (Lonza), дополненной 10% термически инактивированной фетальной бычьей сывороткой (Invitrogen). Две лунки планшета предварительно обрабатывали с помощью 10 мкМ соединения 1 в течение 30 мин, в это время одну из лунок подвергали воздействию 20 нг/мл TNFα (Preprotech) в течение 1 ч. Другие лунки обрабатывали или 20 нг/мл TNFα, или ничем в течение 1 ч. После обработки экстрагировали РНК из клеток с применением набора для экстракции РНК (Qiagen). Образцы РНК из каждой группы обработки обратно транскрибировали и проводили количественную ПЦР в реальном времени на соответствующих последовательностях кДНК с применением зондов к COX-2 (Life Technologies).

Клетки HeLa помещают в 6-луночную чашку для культивирования (5×10^5 клеток/лунка) в среде EMEM (Lonza), дополненной 10% термически инактивированной фетальной бычьей сывороткой (Invitrogen). Две лунки планшета предварительно обрабатывали с помощью 1 мкМ соединения 1 в течение 30 мин, в это время одну из лунок подвергали воздействию 20 нг/мл TNFα (Preprotech) в течение 24 ч. Другие лунки обрабатывали или 20 нг/мл TNFα, или ничем в течение 24 ч. После обработки цельноклеточные лизаты получали из клеток путем лизиса с помощью буфера RTPA, дополненного ингибиторами протеазы и фосфатазы (Roche).

Обнаружение иммуноблоттингом белка COX-2 проводили с применением антитела к COX-2 (Cayman). Интенсивность сигнала для белка COX-2 нормировали к интенсивности сигнала β-актина (Santa Cruz) для каждого образца и отображали графически с помощью произвольных единиц интенсивности.

Данные анализа мРНК с помощью qRT-ПЦР показаны на фиг. 13А. Через 1 ч после обработки TNFα индуцировал приблизительно 8-кратное увеличение экспрессии мРНК COX-2 по сравнению с контролем, тогда как соединение 1 отдельно характеризовалось отсутствием эффекта на уровень экспрессии COX-2. Соединение 1 не вызывало увеличения экспрессии мРНК COX-2.

Данные анализа белка с помощью иммуноблоттинга показаны на фиг. 13В. Клетки HeLa оставляли необработанными, обрабатывали или 20 нг/мл TNFα, или 1 мкМ соединения 1, или 20 нг/мл TNFα и 1 мкМ соединения 1 в течение 24 ч, затем оценивали количество присутствующего белка COX-2 путем обнаружения с помощью иммуноблоттинга. Содержание белка COX-2 увеличилось за 24 ч в стимулированных TNFα клетках по сравнению с необработанным контролем и с обработанными соединением 1 клетками, при этом соединение 1 снижало количество белка COX-2 в присутствии TNFα. Интенсивность сигналов иммуноблоттинга для белка COX-2 нормировали к интенсивности сигналов Р-актина для каждого образца и представляли графически.

Соединение 1 не оказывает воздействия на индуцированную TNFα экспрессию COX-2, но действительно снижает уровень индуцированной TNFα экспрессии белка COX-2.

Соединение 1 локализует связанные с воспалением транспортируемые CRM1 белков в ядре.

Клетки HeLa и THP-1 (острый моноцитарный лейкоз человека) обрабатывали индуцирующим воспаление фактором TNFα отдельно или в комбинации с 1-10 мкМ соединения 1 в течение 4-24 ч и затем анализировали с помощью иммунофлуоресценции (IF) в отношении ядерной локализации связанных с воспалением транспортируемых CRM1 белков IκB, Nrf2, HMGB1, FoxP3, FOXO1a, RxRα, PPARγ и NFκB (субъединица p65).

Для обнаружения локализации IκB, Nrf2, RxRα и PPARγ клетки предварительно инкубировали с 10 мкМ соединения 1 в течение 30 мин с последующей инкубацией с 20 нг/мл TNFα в течение 4 ч в бессывороточных средах. Для обнаружения HMGB1, FoxP3 и Foxo1A клетки предварительно инкубировали с 1 мкМ соединения 1 в течение 2 ч с последующей инкубацией с 20 нг/мл TNFα в течение 24 ч. Для обнаружения NFκB клетки предварительно инкубировали с 1 мкМ соединения 1 в течение 2 ч с последующей инкубацией с 20 нг/мл TNFα в течение 24 ч. Клетки или фиксировали с помощью 100% ледяного метанола (MeOH) и пермеабелизировали/блокировали с помощью 0,1% Tween 20, 0,3 М глицина и 1% BSA в

PВ, или фиксировали с помощью PFA (3% параформальдегида и 2% сахарозы в PBS) и пермеабилizировали/блокировали с помощью 0,1% Triton-X100 и 1% BSA в PBS. IκB обнаруживали с помощью первичного моноклонального (E130) антитела кролика от Abcam (ab32518); Nrf2 обнаруживали с помощью первичного поликлонального антитела кролика от Santa Cruz (sc722); RxRα обнаруживали с помощью первичного поликлонального антитела кролика от Santa Cruz (sc553); PPARγ обнаруживали с помощью первичного моноклонального [E130] антитела кролика от Cell Signaling (#2443); Foxo1A обнаруживали с помощью первичного моноклонального [C29H4] антитела кролика от Cell Signaling (#2880); FDVIGB1 обнаруживали с помощью первичного поликлонального антитела кролика от Abcam (ab18256); FoxP3 обнаруживали с помощью первичного поликлонального антитела кролика от Abcam (ab10563); NFκB-p65 обнаруживали с помощью первичного моноклонального [C22B4] антитела кролика от Cell Signaling (#4764). Вторичное антитело кролика Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A11008) применяли для всех окрашиваний. Изображения получали при 20X увеличении.

Локализация связанных с воспалением транспортируемых CRM1 белков в ядре оказывало неблагоприятные эффекты на воспаление, и, следовательно, анализы IF могут служить в качестве биомаркеров для противовоспалительных эффектов ингибиторов CRM1.

IκB представляет собой ингибитор NFκB, который индуцирует экспрессию провоспалительных путей. Поскольку основное расщепление IκB происходит в цитоплазме, его локализация в ядре защищает IκB от расщепления и обеспечивает его связывание с ядерным NFκB, блокируя провоспалительную активность NFκB. Nrf2 представляет собой транскрипционный фактор типа лейциновой молнии, который индуцирует в ядре экспрессию противовоспалительной активности. FDVIGB1 представляет собой фактор бокс 1 высокомолекулярной группы и, как правило, он плотно связан с хроматином. При активной секреции или пассивном высвобождении из поврежденных клеток HMGB1 функционирует как цитокин и индуцирует провоспалительный ответ. Блокирование HMGB1 в ядре предотвращает его провоспалительные эффекты. FoxP3, forkhead бокс P3, функционирует как основной транскрипционный фактор в развитии и функции регуляторных T-клеток, которые обладают иммуносупрессорной активностью. FOXO1a представляет собой транскрипционный фактор, способный индуцировать такие противовоспалительные гены, как ангиопоэтин-2. Следовательно, ядерная локализация защищает FOXO1a от фосфорилирования, выхода из ядра и последующего расщепления. RxRα представляет собой ретиноидный ядерный рецептор, который регулирует экспрессию таких хемокинов, как Ccl6 и Ccl9 в макрофагах. RxRα необходим для рекрутинга лейкоцитов в места воспаления. Ядерный захват RxRα приводит к рекрутингу и истощению транскрипционных коактиваторов, которые иначе служат для связывания таких провоспалительных транскрипционных факторов, как NFκB. PPARγ представляет собой активируемый лигандом транскрипционный фактор, принадлежащий к надсемейству ядерных рецепторов, и он регулирует экспрессию противовоспалительных генов.

Результаты, показанные на фиг. 14А и 14В, демонстрируют ядерную локализацию вышеперечисленных транспортируемых белков даже в присутствии TNFα, который, как известно, индуцирует воспаление. Результаты указывают на способность соединения 1 индуцировать противовоспалительные пути для преодоления воспаления.

Оценка эффекта соединения 1 на когнитивные расстройства после повреждения BCCIу крыс.

Билатеральное контролируемое повреждение коры вследствие удара (BCCI) медиальной фронтальной коры (MFC) самцов крыс линии Sprague Dawley индуцировали с помощью устройства для нанесения закрытой травмы коры головного мозга. После CCI любое поверхностное кортикальное кровоизлияние контролировали и зашивали фасцию и кожу черепа. Ложнооперированным крысам вводили анестезию, помещали в стереотаксический аппарат и проводили краниотомию.

Прогестерон 16 мг/мл растворяли в 22,5% 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина и начальную инъекцию (16 мг/кг) вводили интраперитонеально через 1 ч после повреждения. Оставшиеся инъекции (все по 16 мг/кг) вводили подкожно через 6 ч после повреждения и продолжали в течение 5 дней после повреждения. Инъекции прогестерона делали в концентрации 1 мл/кг. Прогестерон применяли в качестве контроля.

Соединение 1 в концентрации 0,2, 0,4, и 0,6 мг/мл суспендировали в инертном носителе (0,6% мас./об. Pluronic® F-68 и 0,6% мас./об. PVP K-29/32 в воде) и вводили перорально в концентрации, составляющей 10 мл/кг, за 16 ч до повреждения и через 2 ч после повреждения и введения продолжали в течение 4 дней. Контрольные крысы получали эквивалентные инъекции инертного носителя для соединения 1 в те же моменты времени. Группы лечения обобщенно представлены в табл. 11.

Группы лечения

Группа	Количество животных	Исследуемое соединение	Доза	Путь введения	Схема
1	8	Инертный носитель+ложная операция	N/A	PO	за 16 ч до повреждения, через 2 ч после повреждения и продолжали в течение 4 дней.
2	8	Инертный носитель+BC CI	N/A	PO	за 16 ч до повреждения, через 2 ч после повреждения и продолжали в течение 4 дней.
3	8	Прогестерон	16 мг/кг	IP+SC	через 1 ч после повреждения, [IP] через 6 ч после повреждения и продолжали в течение 5 дней после повреждения [SC]
4	8	Соединение 1	2 мг/кг	PO	за 16 ч до повреждения, через 2 ч после повреждения и продолжали в течение 4 дней.
5	8	Соединение 1	4 мг/кг	PO	за 16 ч до повреждения, через 2 ч после повреждения и продолжали в течение 4 дней.
6	8	Соединение 1	6 мг/кг	PO	за 16 ч до повреждения, через 2 ч после повреждения и продолжали в течение 4 дней.

Тест водного лабиринта Морриса (MWM) представляет собой задачу пространственного ориентирования, которая измеряет обучение и память у грызунов с применением визуальных стимулов. Субъекты со временем учатся находить скрытую платформу. Тест MWM проводили через две недели после повреждения. Самцов крыс линии Sprague Dawley оставляли плавать в бассейне, пока они не достигали платформы, расположенной в юго-западной четверти емкости или до истечения 90 с. Поведение фиксировали с помощью видеокамеры, подвешенной над бассейном и регистрировали и анализировали с применением программного обеспечения для анализа видеозаписи (ANY-maze).

Эффекты соединения 1 и прогестерона на результаты достижения платформы в тесте MWM показаны на фиг. 15 А. Двухфакторный дисперсионный анализ обнаружил значительный эффект лечения. По сравнению с ложнооперированными крысами поврежденные с помощью BCCI животные показали значительный дефицит пространственного обучения, на что указывало значительное увеличение латентного периода для нахождения скрытой платформы в течение 5-дневной фазы достижения (фиг. 15А). По сравнению с получившими лечение с помощью инертного носителя крысами с повреждением BCCI соединение 1 (2, 4 и 6 мг/кг) показало дозозависимое снижение латентного периода для обнаружения скрытой платформы со значительными эффектами в 17 и 18 дни после повреждения с помощью 6 мг/кг и в 18 день с помощью 4 мг/кг. Данные указывают на то, что соединение 1 характеризуется нейропротекторным эффектом.

На фиг. 15С представлены фотографии цельного головного мозга животных, получивших ложные поражения (симуляция), CCI + инертный носитель (контроль) или CCI + соединение 1 (6 мг/кг), и на ней показаны результаты качественного визуального осмотра цельного головного мозга перед получением срезов с помощью вибратора. Осмотр показал, что ни одно (0 из 4) из ложнооперированных животных не проявило повреждение дорсально-медиальной кортикальной ткани. Сильно отличаясь от этого, все четыре контроля CCI проявили тяжелое билатеральное повреждение, ограниченное указанной областью коры. Животные с CCI, которые получили соединение 1, показали повреждение в диапазоне от умеренного до минимального. Следует отметить, что головной мозг, демонстрирующий наиболее тяжелое повреждение в группе соединения 1, был менее поражен, чем все образцы головного мозга в группе контроля CCI.

Измеряли уровни экспрессии некоторых цитокинов в плазме, собранной от крыс в каждой группе лечения. Образцы получали замороженными и хранили при -80°C. В день эксперимента образцы оттаивали, разбавляли в четыре раза и анализировали в отношении экспрессии цитокинов на платформе Luminex. Образцы анализировали в отношении цитокинов GRO/KC, IFN γ , IL-1B, IL-6, IL-10, IL-12p70 и TNF α с применением мультиплексного набора, произведенного Millipore. Как показано на фиг. 15В, между образцами наблюдали одинаковые паттерны в уровнях экспрессии.

Наибольшее изменение наблюдали для IL-10. Соединение 1 в концентрации 6 мг/кг снижало IL-10 по сравнению с получившей лечение с помощью инертный носитель контрольной группой.

Во многих случаях травматическое повреждение вызывает вторичный ответ на повреждение. В большинстве случаев результатом будет воспаление. Воспалительным ответом управляют цитокины и

хемокины и частично он распространяется с помощью происходящих из поврежденной ткани продуктов (ассоциированный с повреждением молекулярный паттерн).

Синдром полиорганной недостаточности (MODS), малопонятный синдром последовательной и постепенной потери функции органов, представляет собой наиболее частую причину поздних смертельных исходов после повреждения, лежащую в основе существенной заболеваемости и смертности. Предполагают, что MODS обусловлен частично избыточной или неадекватной активацией воспалительных путей.

Количественные измерения клеточной плотности собирали от иммуномеченных антителом к NeuN срезов приблизительно на 2-3 мм спереди от брегмы. Представляющие интерес участки (ROI) очерчивали (слепым образом в отношении условия эксперимента) около слоев IV-VI в кортикальной области, прилежащей к месту повреждения у получивших повреждение с помощью CCI животных или в эквивалентной зоне (дорсальная кора) у ложнооперированных животных. ROI аналогичной площади также оценивали в вентральной кортикальной области того же среза. Идентификацию клеток проводили с применением модуля для подсчета клеток программного обеспечения Keyence BZ-II Analyzer. Коэффициенты отношения площади клеток к серому веществу (CG) определяли для каждого ROI. Ложнооперированные животные проявляли мечение однородной плотности в пределах как дорсальной, так и вентральной областей. Как предполагали, контрольные животные с CCI показали сниженные коэффициенты CG как в дорсальной (-45% по сравнению с ложнооперированными животными), так и вентральной (-30% по сравнению с ложнооперированными животными) кортикальных зонах по сравнению с ложнооперированными животными (фиг. 15D). Индуцированное CCI снижение коэффициента CG ослаблялось с помощью воздействия соединением 1 в вентральной коре (-3% по сравнению с ложнооперированными животными; $p = 0,09$). Хотя эффект соединения 1 по сравнению с воздействием инертным носителем в вентральной коре не являлось статистически значимым, предполагают, что указанный эффект достигнет статистической значимости в большем исследовании. Отсутствие эффекта соединения 1 обнаружили в дорсальной кортикальной области (-32% по сравнению с ложнооперированными животными), непосредственно прилегающей к месту повреждения. Различие наблюдаемого эффекта соединения 1 на вентральную область по сравнению с дорсальной областью может представлять собой пороговый эффект, связанный со степенью повреждения, что обратно пропорционально расстоянию от места повреждения. Таким образом, повреждение дорсальной кортикальной области могло быть слишком тяжелым, чтобы быть восстановленным с помощью соединения 1 при указанных условиях.

Иммунофлуоресцентный анализ проводили для оценки воздействия TBI на некоторые пути иммунного ответа и для определения того, может ли соединение 1 опосредовать свои нейропротекторные эффекты посредством одного или нескольких указанных путей. Полуколичественные измерения вторичных ответов на повреждение исследовали с применением иммунофлуоресцентного мечения для антитела к IgG крысы (индикатора проницаемости через гематоэнцефалический барьер (BBB)) и TNF α (индикатора воспаления нейронов). Получали изображения всех маркеров при 20X увеличении в областях коры, окружающих место повреждения в непосредственной близости к срезам в пределах 300 мкм к тем срезам, которые использовали для оценок мечения NeuN. Для каждой метки целевой ROI очерчивали в пределах слоев IV-VI, смежных с местом повреждения (или эквивалентную область дорсальной коры для ложнооперированных животных) и эталонный ROI собирали из аналогичных слоев в вентральной коре. Нормализованную интенсивность флуоресценции оценивали в каждом из двух ROI. Для всех меток эталонное место в вентральной коре, как определяли, не отличалось между группами ($p > 0,5$); следовательно, определяли процентное отношение целевого участка к эталонному (IF).

Антитело к IgG крысы экспрессировали в нейронах (которые указаны стрелкой на фиг. 15E) в поврежденной ткани. На фиг. 15E показано, что антитело к IgG распределялось в пределах нейронов поврежденных областей кортикальной ткани. Антитело к IgG крысы не присутствовало в ложнооперированной ткани. TNF α иммуноположительные клетки (показанные стрелкой на фиг. 15E) ясно заметны в поврежденной ткани, окружающей место повреждения у контрольных животных. Указанные элементы, как правило, отсутствовали у получивших лечение с помощью соединения 1 и ложнооперированных животных. На фиг. 15E показано, что соединение 1 снижает вторичные ответы на повреждение у крыс, подвергнутых повреждению головного мозга.

Исследование № 2 индуцированного коллагеном артрита (CIA).

Для дополнительного исследования эффекта описанных в настоящем документе соединений на биомаркеры воспаления инициировали вторую модель CIA. В этой модели группы обозначали как группа А (нативные животные), группа В (модель; получившие лечение с помощью инертного носителя), группа С (соединение 2 в дозе 5 мг/кг QoD). Крыс в группах В и С иммунизировали внутривенно с помощью бычьего коллагена типа II в IFA в 0 день, и бустерную инъекцию вводили на 7 день. Соединение 2 перорально вводили крысам с CIA после появления артрита (день 11). Развитие CIA оценивали посредством макроскопической оценки в баллах и измерений отека лапы. Указанные параметры оценивали каждый день в течение первых 5 дней после сенсibilизации (день 7), и затем дважды в неделю (понедельник и четверг) до 28 дня с применением системы клинических показателей, описанной в табл. 7 выше. Кроме того, анализы ELISA для CD45, CRP, CCL2/MCP-1, TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-17 и измерения для

катепсина К и эластазы проводили через 4 дня (15 день исследования) и 10 дней (21 день исследования - пик заболевания) после введения соединения и в самом конце исследования (28 день) на животных всех групп. Кроме того, в последний день исследования (28 день) несколько репрезентативных животных из каждой группы подвергали трехмерной микротомоденситометрии пяточной кости и количественно определяли эрозию кости в лапах.

На фиг. 16А и 16В показано, что крысы, получившие лечение с помощью соединения 2 в дозе 5 мг/кг, характеризовались значительно сниженным отеком сустава (фиг. 16В) и клиническими показателями (фиг. 16А) по сравнению с получившими лечение с помощью инертного носителя крысами.

На фиг. 17А и 17В показано, что крысы, получившие лечение с помощью соединения 2 в дозе 5 мг/кг, характеризовались значительно сниженной эрозией кости в задних лапах по сравнению с получившими лечение с помощью инертного носителя крысами. Состояние сустава у животных, получивших лечение с помощью соединения 2, было сопоставимо с таковым у нативных животных. Напротив, получившие лечение с помощью инертного носителя животные проявляли статистически значимое увеличение эрозии кости в своих задних лапах.

Анализ LUMINEX® и ELISA использовали для измерения эффектов соединения 2 на содержание провоспалительных цитокинов и маркеров воспаления.

Синовиальную жидкость собирали на 21 день после первой иммунизации от 2 крыс в группе из модели и 2 крыс в группе, получившей лечение с помощью соединения 2, и в конце исследования от 2 крыс в нативной группе, 3 крыс в группе модели и 3 крыс в получившей лечение с помощью соединения 2 группе.

На фиг. 17С-17F показано, что по сравнению с группой модели соединение 2 показало ингибирующие эффекты на продукцию провоспалительных цитокинов и маркера воспаления в образцах синовиальной жидкости. Сниженные цитокины включают в себя IL-1 β , IL-6 и MCP-1, и маркер воспаления представляет собой С-реактивный белок (CRP).

Анализ LUMINEX® также использовали для измерения содержания провоспалительных цитокинов в сыворотке. Образцы сыворотки (1 мл крови на крысу) собирали через 4 дня после введения соединения (15 день), 10 дней после введения соединения (как правило, на пике заболевания - 21 день) и в конце исследования (27 день).

На фиг. 17G показано, что по сравнению с группой модели соединение 2 показало ингибирующий эффект на продукцию IL-1 β в образцах сыворотки.

Модель экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ).

Модель ЕАЕ представляет собой принятую модель для исследования таких демиелинизирующих заболеваний ЦНС человека, как рассеянный склероз. Эффекты соединения 1 исследовали в индуцированной MOG мышинной модели ЕАЕ у самок мышей линии C57BL/6J. Животных делили на 3 группы, обозначенные как группа I (контроль - инертный носитель), группа II (положительный контроль - дексаметазон) и группа III (соединение 1 в дозе 7,5 мг/кг). Солевой раствор, дексаметазон и соединение 1 вводили согласно схеме, показанной на фиг. 18А. Солевой раствор и дексаметазон вводили интраперитонеально каждый день, начиная с 0 дня. Соединение 1 в дозе 7,5 мг/кг вводили перорально, начиная с 11 дня (появление заболевания) в понедельник, среду и пятницу в течение 3 последующих недель. Заболевание индуцировали с помощью одной внутрикожной инъекции MOG, эмульгированного в полном адьюванте Фрейнда (CFA) в 0 день исследования с последующей интраперитонеальной дополнительной иммуностимуляцией с помощью коклюшного токсина (РТ), проведенной в 0 день исследования и повторно через 48 ч на 2 день исследования.

Как показано на фиг. 18В, первые признаки заболевания отмечали через 7-9 дней после иммунизации с помощью MOG, и пик заболевания развивался на 17 день исследования. Лечение с помощью дексаметазона, начатое с 0 дня в дозе, составляющей 1 мг/кг IP, значительно снижало клинические показатели в 8-37 дни исследования (группа II) по сравнению с контрольной группой, получившей инертный носитель (группой I). Лечение с помощью соединения 1, начатое с 11 дня в дозе, составляющей 7,5 мг/кг (группа III), значительно снижало показатель и тяжесть заболевания. Указанные результаты показаны на фиг. 18В.

Принимая во внимание данные, полученные при условиях настоящего исследования, лечение с помощью соединения 1 в дозе, составляющей 7,5 мг/кг перорально, начиная с 11 дня исследования, приводило к снижению клинического показателя и тяжести заболевания.

Пример 18. Модели заживления раны.

Материалы.

Мыши - мыши линии C57BL/6J, самцы, возрастом 6-8 недель, SPF, полученные от Harlan Laboratories LTD. Мышей содержали в стерильных отдельных вентилируемых клетках (IVC) с пищей и водой, доступными ad libitum, свето-темновым циклом 12 ч/12 ч, контролируемой температурой, составляющей 19-21°C, контролируемой влажностью, составляющей 40-60%, положительным атмосферным давлением внутри помещения с животными и контролем с отчетом о состоянии здоровья каждые 3 месяца, который проводили на выбранных сигнальных животных.

Свиньи - *sus scrofa domestica*, домашняя свинья (главным образом, породы Ландрас X большая белая), самки, приблизительно 60 кг, возрастом 4-5 месяцев, Lahav Institute of Animal Research, Kibbutz Lahav, Israel. Свиней содержали в среде без SPF, водопроводная вода ad libitum непосредственно из коммунального источника воды, пища согласно рекомендациям таблиц стандартного роста под наблюдением ветеринара.

Изофлуран 99,9% для ингаляции, № партии 6027962, Abbot Laboratories Ltd, England.

Вода - вода для инъекций, № партии 11481012, B. Braun Melsungen AG, Germany.

Солевой раствор - 0,9% хлорид натрия для инъекций, № партии 12224012, B. Braun Melsungen AG, Germany.

ДМСО - диметилсульфоксид, D2650, Sigma-Aldrich Inc., U.S. PLURONIC® F-68 PVP K-29/32.

Оценка эффектов системного введения и местного нанесения соединения 1 на кожные раны у мышей линии C57BL.

Эффекты соединения 1 на заживление кожных ран исследовали в мышинной модели продольной резаной раны на всю толщю кожи. При поступлении животных метили для идентификации с помощью ушных бирок, взвешивали и оставляли для акклиматизации на несколько дней перед началом эксперимента. В день нанесения раны мышей взвешивали и делили на 6 экспериментальных групп по 6 животных на группу согласно стратифицированной рандомизации с учетом различий в массе. Перед хирургической процедурой мышам вводили анестезию с помощью изофлурана и шерсть на спине животных состригали. Продольные разрезы на всю толщю кожи по 20 мм проводили с применением стандартного лезвия скальпеля на спинах животных (параллельно позвоночнику). Через 3 ч после нанесения ран вследствие эластичности кожи и активности животных разрезы принимали эллиптические формы. На этой стадии самую широкую область раны измеряли, чтобы установить исходную ширину раны. Оценка заживления ран проводили путем измерения самой широкой области раны. Группы лечения состояли из введения через пероральный зонд или групп местного введения. Во время эксперимента раны фотографировали и проводили морфологический анализ. В конце эксперимента через 8 дней после нанесения ран мышей умерщвляли, показатели ширины ран измеряли и биоптаты из области раны собирали и подвергали анализу.

Таблица 12

Исходные группы исследования

Группа	Количество мышей	Исследуемое соединение	Доза	Путь введения	Схема
1	6	Контроль водный раствор 0,6% масса/объем Pluronic® F-68 и 0,6% масса/объем PVP K-29/32	0,2 мл	РО	через день
2	6	Соединение 1 в PVP/Pluronic® F-68	4 мг/кг	РО	через день
3	6	Соединение 1 в PVP/Pluronic® F-68	7,5 мг/кг	РО	через день
4	3	Инертный носитель, вода для инъекций	0,2 мл	местный	ежедневно
5	6	Соединение 1 в воде	2,5 мкМ	местный	ежедневно
6	6	Соединение 1 в воде	1 мкМ	местный	ежедневно

Свежие растворы дозировок готовили каждый день введения дозы. Соединение 1 для перорального зонда поставляли в виде лиофилизированного порошка и разводили в водном растворе 0,6% мас./об. Pluronic® F-68 и 0,6% мас./об. PVP K-29/32 для получения 0,75 мг/мл маточной суспензии, которую впоследствии разбавляли водным раствором 0,6% мас./об. Pluronic® F-68 и 0,6% мас./об. PVP K-29/32 для получения рабочих растворов в концентрации 7,5 мг/кг и 4 мг/кг. Соединение 1 для местного нанесения поставляли в виде лиофилизированного порошка и суспендировали в воде до концентрации 10 мМ, которую дополнительно разбавляли водой для достижения конечной рабочей концентрации для местного нанесения.

В качестве части ежедневной морфологической оценки, фотографирование проводили с применением цифрового фотоаппарата FinePix S700. На фиг. 19 представлены фотографии репрезентативных ран от каждой экспериментальной группы на 5 день после нанесения ран. Черная масштабная метка представляет 1 см. В общем 33 раны получили у 33 мышей. Морфологическая оценка продемонстрировала

положительный эффект лечения с помощью соединения 1, или перорально или местно. Все виды лечения индуцировали намного лучшее заживление ран, чем контроли. Получившие лечение раны были меньше в размерах и корки были светлее, тоньше и гомогенными без трещин, указывая на более позднюю стадию заживления раны. При оценке в тот же день, что и группы лечения, раны контрольной группы оказались больше в размере и были покрыты толстыми растрескавшимися корками, которые оставляли открытыми незажившие области раны (наблюдаемые как красноватые и розовые области) как на краях, так и в середине ран.

Морфологический анализ представляет собой первичный параметр, используемый в оценке заживления ран в доклинических исследованиях на животных и в клиническом лечении ран человека. На основании морфологического анализа соединение 1 проявляло эффективность и характеризовалось положительным влиянием на заживление ран. Следует отметить, что как местное нанесение, так и системное введение соединения 1 приводило к лучшему заживлению ран, что измеряли с помощью уменьшения размера ран и лучших свойств в процессе образования корок.

Оценка эффектов местного нанесения исследуемого соединения на кожные раны у свиней.

Эффекты исследуемого соединения на заживление кожных ран можно исследовать на модели продольной резаной раны на всю толщину кожи у свиней. При поступлении животных метили для идентификации с помощью ушных бирок, взвешивали и оставляли для акклиматизации на несколько дней перед началом эксперимента. За три дня до операции свиней переносят в операционную для акклиматизации. За 12 ч до процедуры отменяли подачу пищи. В день операции свинье вводят анестезию с применением кетамина, ксилазина, диазепам и изофлурана. Шерсть на задней стороне грудного и брюшного отделов аккуратно состригают с помощью машинки для стрижки волос Oster® (размер лезвия 30) и 20 отдельных участков по 4 см² каждый отмечают в двух рядах (по 10 участков на ряд). Десять пар продольных разрезов на всю толщину кожи по 2,5 см делают с применением лезвия скальпеля #11, на 4 см с обеих сторон от середины спины.

После хирургической процедуры раны делят на экспериментальные группы и обрабатывают ежедневно путем местного нанесения на область раны и на края раны. Область обработки состоит из поверхности кожи до расстояния в 2 см от центра раны. Растворы дозировок наносят постепенно на каждую рану с применением пипетки, пока весь объем для обработки (например, 1 мл солевого раствора или исследуемого соединения) не абсорбируется тканью.

Через несколько часов после нанесения ран вследствие эластичности кожи и активности животных разрезы приобретали эллиптические формы. На этой стадии самую широкую область раны измеряют, чтобы установить исходную ширину раны.

Оценку заживления раны производят путем измерения самой широкой области раны. Во время эксперимента раны фотографируют и проводят морфологический анализ.

В конце эксперимента (например, через 12 дней после нанесения ран) свиней умерщвляют путем введения анестетика и KCl. Оценивают морфологию ран, измеряют ширину раны и биоптаты из области раны собирают и фиксируют с применением 4% параформальдегида для дальнейшего анализа. После фиксации раневые биоптаты фотографируют с применением цифрового фотоаппарата с высоким разрешением, например, FinePix S700, и биоптаты области раны подвергают гистопатологическому анализу. Оценку заживления ран проводят попарно, при этом каждую рану, получившую лечение с помощью исследуемого соединения непосредственно сравнивают с контрольной раной в том же анатомическом положении на другой стороне от середины спины. Указанная парная оценка заживления является крайне важной в отношении объективной оценки и объективного сравнения получивших лечение ран с не получившими лечение ранами, из-за изменчивости, связанной со степенью васкуляризации и кровообращения в коже на различных участках спины свиньи. Раны, расположенные на фронтальной области вблизи шеи, показывают намного лучшие свойства заживления, чем раны, расположенные внизу спины.

Таблица 13

Исходные группы исследования

Группа	Количество ран	Исследуемое соединение	Доза	Путь введения	Схема
1	5 ран спереди на правой стороне	Контроль солевой раствор	1 мл	местный	ежедневно
2	5 ран сзади на правой стороне	Контроль солевой раствор	1 мл	местный	ежедневно
3	5 ран спереди на левой стороне	Исследуемое соединение	3 мкМ	местный	ежедневно
4	5 ран сзади на левой стороне	Исследуемое соединение	1 мкМ	местный	ежедневно

Свежие растворы дозировок получают в каждый день введения дозы. Исследуемое соединение представляют в виде лиофилизированного порошка и впоследствии разводят в растворе 0,9% хлорида натрия

для инъекции для получения 3 мг/мл маточной суспензии. Маточную суспензию впоследствии разбавляют раствором 0,9% хлорида натрия для инъекции до конечных концентраций 3 мкМ и 1 мкМ для местного нанесения.

Гомогенные, тонкие и однородные поверхности корок без признаков выделений из раны, кровотечения или секрета из раны указывают на заживление ран. Очень гетерогенные, растрескавшиеся и темные по цвету корки указывают на многочисленные случаи экссудации, выделений из раны и кровотечения во время процесса заживления раны.

Оценка эффектов местного нанесения исследуемого соединения на ранние процессы заживления раны у свиней

Эффекты исследуемого соединения на раннее заживление раны можно исследовать в модели продольной резаной раны на всю толщину кожи у свиней. Пять пар по 2,5 см продольных разрезов на всю толщину кожи делают на передней части спины подвергнутых анестезии свиней с применением лезвий скальпеля #11, на 4 см с каждой стороны от середины спины. В пределах нескольких часов после процедуры продольный разрез становится раной эллиптической формы.

Раны делят на экспериментальные группы и обрабатывают ежедневно путем местного нанесения на область раны (включая в себя края и область кожи возле раны). Фаза лечения начинается через 24 ч после нанесения ран. Растворы дозировок наносят постепенно на каждую рану с применением пипетки, пока весь объем для обработки не абсорбируется тканью (например, 1 мл солевого раствора или исследуемого соединения).

На 5 день состояние заживления раны и морфологию оценивают согласно следующим параметрам: кровотечение, выделения из раны, отек, воспаление, выделение гноя и образование корок. Оценку заживления ран проводят попарно, при этом каждую рану, получившую лечение с помощью исследуемого соединения непосредственно сравнивают с контрольной раной в том же анатомическом положении на другой стороне от середины спины.

Таблица 14

Исходные группы исследования

Группа	Количество ран	Исследуемое соединение	Доза	Путь введения	Схема
1	5	Контроль - солевой раствор	1 мл	местный	ежедневно
2	5	Исследуемое соединение	3 мкМ	местный	ежедневно

Свежие растворы дозировок получают в каждый день введения дозы. Исследуемое соединение представляют в виде лиофилизированного порошка и разводят в 0,9% хлорида натрия до 3 мг/мл маточной суспензии. Эту маточную суспензию впоследствии разбавляют с помощью 0,9% хлорида натрия для получения местного раствора с конечной концентрацией 3 мкМ.

Морфологическую оценку заживления ран проводят на 5 день лечения. Отек исследуют, оценивают в баллах согласно тяжести в каждой ране и документируют как слабую, умеренную или тяжелую. Раны, которые проявляют умеренный и тяжелый отек, представляют как процентное отношение от общего числа ран в экспериментальной группе. Секрет исследуют и оценивают в баллах бинарным способом: рану, которая проявляла минимальную секрецию, рассматривают как положительную, и рану без какой-либо обнаруживаемой секреции рассматривают как отрицательную в отношении указанного параметра. Раны, которые проявляют секреции (положительные в отношении указанного параметра), представляют как процентное отношение от общего числа ран в экспериментальной группе. Корку считают полностью сформировавшейся, когда непрерывный слой твердого, сухого, красноватого, темно-желтого или коричневого образования покрывает всю область раны и сильно прикреплен к раневому ложу и, следовательно, обеспечивает непрерывный и мощный барьер между наружным окружением и поврежденными тканями. Образование корок исследуют и оценивают в баллах бинарным способом: раны, которые проявляли полностью сформированную корку, которая была сухой и крепкой, рассматривают как положительные, и раны без корки или с корками на ранней стадии рассматривают как отрицательные в отношении указанного параметра. Раны с полностью сформированной коркой представляют как процентное отношение от общего числа ран на группу.

Также оценивают отек, секрецию и образование корок. Отек и секреция представляют собой часть избыточного воспалительного ответа, который может задерживать восстановление ткани и индуцировать неэстетическое рубцевание.

Оценка эффектов местного нанесения исследуемого соединения на раннее заживление раны на коже свиней и на раздражения и расчесы, связанные с поврежденной или поврежденной кожей.

Эффект исследуемого соединения на заживление кожных ран можно исследовать в модели продольной резаной раны на всю толщину кожи у свиней. За три дня до операции свиней переносят в операционную для акклиматизации. За 12 ч до процедуры отменяли подачу пищи. В день операции свиней вводят анестезию с применением кетамина, ксилазина, диазепама и изофлурана. Шерсть на задней стороне

грудного и брюшного отделов аккуратно состригают с помощью машинки для стрижки волос Oster® (размер лезвия 30). Намечают десять пар участков по 4 см² каждый и продольные разрезы на всю толщину кожи по 2,5 см делают с применением лезвия скальпеля #11, на любой стороне от середины спины.

После хирургической процедуры раны делят на экспериментальные группы и обрабатывают ежедневно путем местного нанесения на область раны (включая в себя края и область кожи возле раны до расстояния, составляющего 2 см от раны во всех направлениях). Растворы дозировок наносят постепенно на каждую рану с применением пипетки, пока весь объем для обработки не абсорбируется тканью (например, 1 мл инертного носителя или исследуемого соединения).

Через несколько часов после процедуры продольный разрез становится раной эллиптической формы вследствие эластичности кожи и активности животных. Во время эксперимента раны фотографируют и проводят морфологический анализ. Оценку заживления ран проводят попарно, при этом каждую рану, получившую лечение с помощью исследуемого соединения, непосредственно сравнивают с контрольной раной в том же анатомическом положении на другой стороне от середины спины. В течение первых 5 дней после нанесения ран регистрируют морфологию ран и поведение животных.

Таблица 15

Исходные группы исследования

Группа	Количество ран	Исследуемое соединение	Доза	Путь введения	Схема
1	5 ран спереди на правой стороне	0,02% ДМСО в воде	1 мл	местный	ежедневно
2	5 ран сзади на правой стороне	0,067% ДМСО в воде	1 мл	местный	ежедневно
3	5 ран спереди на левой стороне	Исследуемое соединение в 0,02% ДМСО	3 мкМ	местный	ежедневно
4	5 ран сзади на левой стороне	Исследуемое соединение в 0,067% ДМСО	1 мкМ	местный	ежедневно

Свежие растворы дозировок получают в каждый день введения дозы. Исследуемое соединение представляют в виде лиофилизированного порошка и растворяют в 100% ДМСО до маточной концентрации, составляющей 15 мМ. Дальнейшие разведения в воде для инъекции проводят для достижения конечной концентрации, составляющей 3 мкМ и 1 мкМ для местного нанесения.

В качестве части ежедневной морфологической оценки фотографирование ран проводят с применением, например, цифрового фотоаппарата с высоким разрешением FinePix S700. В дополнение к состоянию раны проводят наблюдение за областями раздраженной и поцарапанной кожи. Как правило, расчесы не вызывают повреждения ран или препятствует процессу заживления ран, поскольку рану наносили на спину вблизи середины спины так, чтобы было для животного трудно и почти невозможно достичь ран.

Оценка эффектов соединения 1 в PVP/Pluronic® F-68 и соединения 1 в воде на расчесы, связанные с заживлением кожи у мышей.

В исследованиях кожных ран, описанных в настоящем документе у мышей, также наблюдали за поведением животных и количественно определяли попытки удалить рубцы, признаки дискомфорта и расчесы области раны. Аномальное поведение и аномальные проявления расчесов и признаки боли во всех исследованиях, проводимых на мышках, анализировали. В указанных исследованиях лечение проводили с применением соединения 1 в PVP/Pluronic® F-68 и соединения 1 в воде и с помощью контролей - соответствующего инертного носителя.

Во время всех экспериментов по заживлению ран у мышей проводили мониторинг параметров заживления, связанных с заживлением ран, признаки раздражений кожи и другие кожные состояния в области вблизи раны и обработанной области кожи. Кроме того, во время фазы лечения во всех моделях заживления кожи особое внимание уделяли поведению животных, например признакам дискомфорта и боли; и признакам расчесов и самостоятельных вскрытий ран и кожи. Смягчающие и успокаивающие эффекты лечения соединениями были хорошо выражены по сравнению с контрольными животными, которые были склонны самостоятельно вскрывать свои раны.

У мышей лечение с помощью соединения 1 в PVP/Pluronic® F-68 или соединения 1 в воде снижало случаи самостоятельного вскрытия ран по сравнению с получившими лечение инертным носителем мышками (ДМСО в воде, солевой раствор, PVP/Pluronic или вода).

У мышей самостоятельное вскрытие ран, как правило, приводило к удалению корки и кровотечению или повреждению вновь сформированной ткани на раневом ложе, которая была сильно прикреплена к корке. Подавляющее большинство таких случаев происходило в получивших лечение инертным носителем группах (приблизительно 20-30% во всех экспериментах).

Обобщая оценки состояния кожи и поведения животных, можно сделать вывод, что лечение ран с

помощью соединения 1 в PVP/Pluronic® F-68 или соединения 1 в воде предотвращало самостоятельное вскрытие ран у мышей, возможно, вследствие некоторых смягчающих и успокаивающих эффектов лечения соединениями поврежденной и раздраженной кожи.

Эффект дозы исследуемого соединения на заживление ран кожи у мышей.

Эффекты исследуемого соединения на заживление ран кожи можно исследовать в мышинной модели продольной резаной раны на всю толщу кожи. При поступлении всех животных метят для идентификации с помощью ушных бирок, взвешивают и оставляют акклиматизироваться в течение нескольких дней перед началом эксперимента. В день нанесения ран мышей взвешивают и делят на 7 экспериментальных групп (N=6 или N=7) согласно стратифицированной рандомизации с учетом различий в массе. Группа инертного носителя получает 0,1% ДМСО в воде, тогда как группа положительного контроля получает лечение с помощью водного раствора 0,6% мас./об. Pluronic® F-68 и 0,6% мас./об. PVP K-29/32. Перед хирургической процедурой мышей подвергают действию анестезии с помощью изофлурана и шерсть на спине животных состригают. Продольные разрезы на всю толщу кожи по 20 мм проводят с применением стандартного лезвия скальпеля на спинах животных (параллельно позвоночнику). Через 3 ч после нанесения ран вследствие эластичности кожи и активности животных разрезы принимают эллиптические формы. На этой стадии самую широкую область раны измеряют, чтобы установить исходную ширину раны. Оценка заживления ран проводят путем измерения самой широкой области раны. Лечение ран проводят местным нанесением (ежедневно) растворов дозировок (например, 0,2 мл) непосредственно на раны.

Таблица 16

Исходные группы исследования

Группа	Количество мышей	Исследуемое соединение	Доза	Путь введения	Схема
1	7	0,1% ДМСО в воде	0,2 мл	местный	ежедневно
2	6	Исследуемое соединение в 0,1% ДМСО	9 μ M	местный	ежедневно
3	6	Исследуемое соединение в 0,1% ДМСО	3 μ M	местный	ежедневно
4	6	Исследуемое соединение в 0,1% ДМСО	1 μ M	местный	ежедневно
5	6	Исследуемое соединение в 0,1% ДМСО	0,3 μ M	местный	ежедневно
6	7	Контроль - водный раствор 0,6% масса/объем Pluronic® F-68 и 0,6% масса/объем PVP K-29/32	0,2 мл	местный	ежедневно

Свежие растворы дозировок получают в каждый день введения дозы. Исследуемое соединение поставляют в виде лиофилизированного порошка и разводят в 0,1% ДМСО в воде до 3 мг/мл маточной суспензии. Маточную суспензию впоследствии разбавляют с помощью 0,1% ДМСО в воде для получения конечного раствора для местного нанесения. Раны в контрольных группах обрабатывают местно с помощью 0,1% ДМСО в воде или водного раствора 0,6% мас./об. Pluronic® F-68 и 0,6% мас./об. PVP K-29/32.

В конце эксперимента через 8 дней после нанесения раны мышей умерщвляют путем ингаляции CO₂, показатели ширины ран измеряют и биоптаты из области раны собирают и подвергают гистологическому анализу. Биоптаты фиксируют с применением 4% параформальдегида. После фиксации всей раневой поверхности делают 5 мм рассечение самой широкой области раны и указанные образцы подвергают погружению в парафин. Парафиновые блоки получают с использованием стандартных процедур постепенной дегидратации и погружения тканей в парафин. После этого получают гистологические срезы и ткани окрашивают гематоксилином и эозином (H&E). Окрашенные H&E срезы исследуют и проводят оценку эффективности заживления раны.

Прогрессирующее дермальное закрытие оценивают на день 8 путем исследования окрашенной эозином здоровая дермы и краев вновь сформированной дермы на раневой щели. Раны с обоими дермальными краями, наблюдаемыми в поле микроскопа при увеличении 100 $\times$ (BX41 Olympus или Axiovert 25, Zeiss) рассматривают положительными в отношении параметра заживления прогрессирующего дермального закрытия. Количество ран с прогрессирующим дермальным закрытием представляют как процент от общего числа ран в экспериментальных группах.

Прогрессирующее эпидермальное закрытие оценивают на 8 день с применением окрашивания Н&Е путем анализа гистологического среза на самой широкой области раны. Раны, которые проявляют присутствие непрерывного слоя эпидермиса, покрывающего всю раневую щель, и раны с наиболее прогрессирующей миграцией эпидермальных краев, наблюдаемой в поле микроскопа при увеличении 400х, рассматривают как положительные в отношении параметра прогрессирующего эпидермального закрытия. Результаты представляют как процент от общего на экспериментальную группу.

Эпидермальную миграцию оценивают на 8 день с применением окрашивания Н&Е путем анализа окрашенных конденсированным гематоксилином вновь образованного эпидермиса на обоих краях раны. Эпидермальный край рассматривают мигрирующим, когда вновь образованный эпидермальный край покрывает приблизительно 20-30% раневой щели. Мигрирующие эпидермальные края в группах подсчитывают и представляют как процент от общего числа эпидермальных краев (умножая на 2 количество ран в группе). Оба эпидермальных края рассматривают мигрирующими в ранах, которые проявляли полное или прогрессирующее эпидермальное закрытие. В общем произвели 62 раны у 62 мышей.

Лечение ран с помощью исследуемого соединения предотвращает такие осложнения в заживлении ран, как гиперплазия эпидермиса и рубцовые сращения.

Эффекты исследуемого соединения на заживление ран кожи можно исследовать в мышинной модели продольной резаной раны на всю толщю кожи. Перед хирургической процедурой мышей подвергают анестезии с помощью изофлурана и спину животных сбивают. Продольные разрезы на всю толщю кожи по 20 мм проводят с применением лезвия скальпеля на спинах (параллельно позвоночнику) животных. Через 3 ч после нанесения ран вследствие эластичности кожи и активности животных разрезы принимают эллиптические формы. Оценку заживления ран проводят путем измерения самой широкой области раны. Лечение ран проводят путем местного ежедневного нанесения, например, 0,2 мл исследуемого соединения непосредственно на раны. Процесс ведения раны частично происходит во влажной среде - после каждой ежедневной обработки раны увлажняют на некоторое время. В конце эксперимента через 8 дней после нанесения ран мышей умерщвляют, показатели ширины ран измеряют и биоптаты из области раны собирают и подвергают гистологическому анализу.

Таблица 17

Исходные группы исследования

Группа	Количество мышей	Исследуемое соединение	Доза	Путь введения	Схема
1	7	0,1% ДМСО в воде	0,2 мл	местный	ежедневно
2	6	Исследуемое соединение в 0,1% ДМСО	3 мкМ	местный	ежедневно
3	6	Исследуемое соединение в 0,1% ДМСО	1 мкМ	местный	ежедневно
4	7	Контроль – водный раствор 0,6% масса/объем Pluronic® F-68 и 0,6% масса/объем PVP K-29/32	0,2 мл	местный	ежедневно

Свежие растворы дозировок получают в каждый день введения дозы. Исследуемое соединение представляют в виде лиофилизированного порошка и разводят в 0,1% ДМСО в воде до 3 мг/мл маточной суспензии, которую впоследствии разбавляют с помощью 0,1% ДМСО в воде для достижения рабочей концентрации для местного нанесения. Раны в контрольных группах местно обрабатывают 0,1% ДМСО в воде или водным раствором 0,6% мас./об. Pluronic® F-68 и 0,6% мас./об. PVP K-29/32.

В конце фазы лечения на 8 день после нанесения ран мышей умерщвляют путем ингаляции CO₂ и собирают биоптаты области раны. Фиксацию тканей раны проводят с применением 4% параформальдегида. После фиксации всей раневой поверхности делают 5 мм рассечение самой широкой области раны и указанные образцы подвергают погружению в парафин. Парафиновые блоки получают с использованием стандартных процедур постепенной дегидратации. После этого получают гистологические срезы и ткани окрашивают гематоксилином и эозином. Параметры заживления раны оценивают и отображают графически.

Гиперплазию эпидермиса оценивают на 8 день. Немигрирующие и гиперплазированные эпидермальные края в группе подсчитывают и представляют как процент от общего числа эпидермальных краев (удваивая количество ран в группе). Гиперплазированные эпидермальные края оценивают с применением окрашивания Н&Е путем анализа окрашенных конденсированным гематоксилином областей эпидермиса. Если эпидермальный край оказывается толще, чем нормальный эпидермис в здоровой области кожи и если такой эпидермальный край не проявляет миграции в направлении раневой щели, его рассматривают как гиперплазированный и немигрирующий.

Рубцовые сращения на раневой щели оценивают на 8 день. Рубцовые сращения оценивают путем анализа клеточных и тканевых структур на раневой щели. Раневые рубцовые сращения оценивают в бал-

лах по шкале: слабые, умеренные или тяжелые. Отрицательный балл присваивают, если на раневой щели существует сгусток или нормальная грануляционная ткань замещена другой тканью, например скелетными мышцами или распространенными лимфоидными тканями. Несколько рубцовых сращений или аномальную грануляцию, имеющую место больше чем на 40% площади раневой щели, рассматривают как тяжелую. Рубцовое сращение рассматривают как слабое, если оно является незначительным и не препятствует нормальному обновлению ткани кожи. Раны с тяжелыми рубцовыми сращениями подсчитывают как процент от общего числа ран на экспериментальную группу и представляют графически, как показано. В общем 32 раны (64 эпидермальных края) получили у 32 мышей.

Одним из наиболее важных осложнений в заживлении раны является гиперплазия эпидермиса. В качестве ответа на сигналы нагрузки, связанные с нанесением ран, происходит пролиферация клеток базального слоя эпидермиса для компенсации потери кожи. В норме, при неосложненном заживлении ран эпидермальные клетки начинают мигрировать в сторону закрытия раневой щели вскоре после пролиферации. Если миграция не происходит или замедляется, например, при кожных осложнениях, вызванных гипергликемией в диабетических ранах, эпидермальная гиперплазия становится выраженной и может вызвать даже большие осложнения в заживлении ран. В острых открытых ранах, как в модели, используемой в настоящем эксперименте, или в острых зашитых ранах, таких как послеоперационные раны, снижение заживления эпидермиса, связанное с гиперплазией эпидермальных краев, увеличивает риск загрязнения и других осложнений заживления раны, таких как раскрытие раны, наличие отделяемой из раны жидкости или выпячивание ткани из раны.

В эффективном процессе заживления раны первичный сгусток крови подвергается постепенным изменениям для образования грануляционной ткани на раневой щели, которая после ремоделирования в итоге становится вновь образованной кожной тканью с полностью восстановленными функциями. Если рубцовое сращение не относящихся к коже тканей происходит в раневой щели, грануляционная ткань не образуется правильным образом и, как результат, конечное ремоделирование ткани ограничивается. Это может вызвать дальнейшие ограничения в функции зажившей кожи.

Лечение ран с помощью исследуемого соединения в основном составе на солевом растворе улучшает заживление ран и предотвращает тяжелые рубцовые сращения.

Эффекты исследуемого соединения на заживление ран кожи исследовали в мышинной модели продольной резаной раны на всю толщину кожи. Хирургические процедуры проводят на самцах мышей линии C57BL возрастом 7-8 недель, подвергнутых анестезии с помощью изофлурана. Перед хирургической процедурой мышам вводят анестезию с помощью изофлурана и шерсть состригают. Продольные разрезы на всю толщину кожи по 20 мм получают с применением стандартного лезвия скальпеля. Через 3 ч после нанесения ран вследствие эластичности кожи и активности животных разрезы принимают эллиптические формы. На этой стадии самую широкую область раны измеряют, чтобы установить исходную ширину раны. Оценку заживления раны проводят путем измерения самой широкой области раны.

Лечение ран проводят путем ежедневного нанесения местно 0,2 мл раствора непосредственно на рану. Процесс ведения раны проводят частично во влажной среде, поскольку после каждой ежедневной обработки раны увлажняют на некоторое время (3-5 ч). В конце эксперимента через 8 дней после нанесения раны мышей умерщвляют, ширину ран измеряют и биоптаты из области раны собирают и подвергают гистологическому анализу.

Таблица 18

Исходные группы исследования

Группа	Количество мышей	Исследуемое соединение	Доза	Путь введения	Схема
1	5	Солевой раствор	0,2 мл	местный	ежедневно
2	7	Исследуемое соединение в солевом растворе	3 мкМ	местный	ежедневно

Свежие растворы дозировок получают в каждый день введения дозы. Исследуемое соединение представляют в виде лиофилизированного порошка и разводят в солевом растворе для получения 3 мг/мл маточной суспензии, которую впоследствии разбавляют солевым раствором для достижения рабочей концентрации, составляющей 3 мкМ для местного нанесения. Раны в контрольных группах местно обрабатывают солевым раствором.

В конце фазы лечения через 8 дней после нанесения ран мышей умерщвляют путем ингаляции CO₂ и собирают биоптаты из области раны. Фиксацию тканей раны проводят с применением 4% параформальдегида. После фиксации всей раневой поверхности делают 5 мм рассечение самой широкой области раны и указанные образцы подвергают погружению в парафин. Парафиновые блоки получают с использованием стандартных процедур постепенной дегидратации. После этого получают гистологические срезы и ткани окрашивают гематоксилином и эозином (H&E). Параметры заживления раны оценивают и отображают графически.

Эпидермальное закрытие оценивают с применением окрашивания H&E путем анализа гистологических срезов на самой широкой области раны. Раны, которые проявляют присутствие непрерывного слоя

эпидермиса, покрывающего всю раневую щель, и раны с наиболее прогрессирующей миграцией эпидермальных краев, когда оба края наблюдали в поле микроскопа с увеличением 400×, рассматривают как положительные в отношении параметра прогрессирующего эпидермального закрытия. Результаты представляют как процент от общего числа на экспериментальную группу.

Дермальное заживление оценивают путем исследования окрашенной эозином здоровой дермы и вновь образованных краев дермы на раневой щели. Раны с обоими дермальными краями, наблюдаемыми в поле микроскопа при увеличении 100× (BX41 Olympus или Axiovert 25, Zeiss), рассматривают как положительные в отношении параметра заживления - прогрессирующего дермального закрытия. Количество ран с прогрессирующим дермальным закрытием представляют как процент от общего числа ран в экспериментальных группах.

Грануляционную ткань оценивают с использованием окрашивания Н&Е. Если первичный фибриновый сгусток замещается фиброзной соединительной тканью, содержащей адипоциты, новые капилляры и инфильтрат, содержащий лимфоидные клетки, макрофаги и клетки плазмы, грануляционную ткань считают ранней. Ранняя грануляционная ткань, замещенная тканью с высокой численностью фибробластов и коллагеновых волокон рассматривают как прогрессирующую. В общем, области прогрессирующей грануляционной ткани на раневой щели регистрируют как процент от общей площади раневой щели. Раневую щель, проявляющую формирование прогрессирующей грануляционной ткани, покрывающей 40% раневой щели, рассматривают как положительную в отношении указанного параметра. Результаты рассчитывают как процент от общего числа ран на группу.

Рубцовые сращения оценивают путем анализа клеточных и тканевых структур на раневой щели. Рубцовые сращения раны оценивают в баллах по шкале: слабые, умеренные или тяжелые. Отрицательный балл присваивают, если на раневой щели существует сгусток или нормальная грануляционная ткань замещена другой тканью, например скелетными мышцами или распространенными лимфоидными тканями. Несколько рубцовых сращений или аномальную грануляцию, имеющую место больше чем на 40% площади раневой щели, рассматривают как тяжелую. Рубцовое сращение рассматривают как слабое, если оно является незначительным и не препятствует нормальному обновлению ткани кожи. Раны с тяжелыми рубцовыми сращениями подсчитывают как процент от общего числа ран на экспериментальную группу и представляют графически, как показано. Девятнадцать ран (38 эпидермальных краев) получили у 19 мышей.

Оценка эффектов местного нанесения исследуемого соединения на процесс заживления и образование рубца на поздних стадиях заживления раны на коже свиней.

Эффекты исследуемого соединения на поздние стадии заживления ран кожи исследовали в модели продольной резаной раны на всю толщу кожи. В день операции свинье вводят анестезию с применением кетамина, ксилазина, диазепам и изофлурана. Шерсть на задней стороне грудного и брюшного отделов состригают и делают 10 пар по 2,5 см продольных разрезов кожи на всю толщу кожи с применением лезвия скальпеля #11, на 4 см с любой стороны от середины спины. После хирургической процедуры раны делят на экспериментальные группы и обрабатывают ежедневно путем местного нанесения на область раны и на края раны, включая в себя обработку кожи вблизи области раны на расстоянии до 2 см от раны во всех направлениях. Растворы дозировок наносят постепенно на каждую рану с применением пипетки, пока весь объем для обработки (например, 1 мл инертного носителя или исследуемого соединения) не абсорбируется тканью. Кожу вблизи раны обрабатывают марлей, смоченной раствором исследуемого соединения или инертного носителя.

Во время эксперимента раны фотографируют и проводят морфологический анализ. В конце фазы лечения (19 день после нанесения ран) свиней умерщвляют введением воды, анестетика и КСI. Исследуют морфологию ран, раны фотографируют и биоптаты из области раны собирают для фиксации и дальнейшего морфологического и гистологического анализа.

Таблица 19

Исходные группы исследования

Группа	Количество ран	Исследуемое соединение	Доза	Путь введения	Схема
1	5 ран спереди на правой стороне	0,02% ДМСО в воде	1 мл	местный	ежедневно
2	5 ран сзади на правой стороне	0,067% ДМСО в воде	1 мл	местный	ежедневно
3	5 ран спереди на левой стороне	Исследуемое соединение в 0,02% ДМСО	3 мкМ	местный	ежедневно
4	5 ран сзади на левой стороне	Исследуемое соединение в 0,067% ДМСО	1 мкМ	местный	ежедневно

Свежие растворы дозировок получают в каждый день введения дозы. Исследуемое соединение по-

ставляют в виде лиофилизированного порошка и растворяют в 100% ДМСО для получения маточного раствора 15 мМ. Впоследствии разведения в воде для инъекций проводят для достижения конечных концентраций, составляющих 3 мкМ и 1 мкМ для местного нанесения.

В конце фазы лечения (19 день после нанесения ран) проводят оценку заживления раны. Полностью зажившие раны регистрируют как процент от общего количества ран на группу. Среднюю ширину рубцов в ранах, которые полностью зажили и проявляли полное открепление корки, также регистрируют. Измеряют рубцы (мм) и рассчитывают среднюю ширину рубцов и стандартное отклонение. В общем получили 20 ран.

В конце фазы лечения (19 день после нанесения ран) свиней умерщвляют путем введения избыточной дозы анестетика и КСI и собирают биоптаты из области раны. Фиксацию раневых биоптатов проводят с применением 4% параформальдегида. После фиксации раневые биоптаты фотографируют с применением, например, цифрового фотоаппарата FinePix S700 при максимальном разрешении.

Библиография

Cronshaw JM and Matunis MJ. 2004. The nuclear pore complex: disease associations and functional correlations *TRENDS Endocrin Metab.* 15:34-39

Falini B et al. 2006. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML *Blood.* 107:4514-4523.

Cai X and Liu X. 2008. Inhibition of Thr-55 phosphorylation restores p53 nuclear localization and sensitizes cancer cells to DNA damage. *PNAS.* 105:16958-16963.

Daelemans D, Afonina E, Nilsson J 2002 A synthetic HIV-1 Rev inhibitor interfering with the CRM1-mediated nuclear export. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(22):14440-5. 98052-2517.

Davis JR et al. 2007. Controlling protein compartmentalization to overcome disease *Pharmaceut Res.* 24:17-27.

Freundt E, Yu L, Park E, et al 2009 Molecular determinants for subcellular localization of the severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame 3b protein. *J Virol* 83(13):6631-40.

Ghildyal R, Ho A, Dias M, et al 2009 The respiratory syncytial virus matrix protein possesses a Crm1-mediated nuclear export mechanism. *J Virol* 83(11):5353-62.

Ghosh CC et al 2008 Analysis of nucleocytoplasmic shuttling of NF kappa B proteins in human leukocytes. *Methods Mol Biol.* 457:279-92.

Gupta N et al 2008 Retinal tau pathology in human glaucomas. *Can J Ophthalmol.* 2008 Feb;43(1):53-60.

Hoshino L et al. 2008. Combined effects of p53 gene therapy and leptomycin B in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology.* 75:113-119.

Lain S et al. 1999a An inhibitor of nuclear export activates the p53 response and induces the localization of HDM2 and p53 to U1A-positive nuclear bodies associated with the PODs *Exp Cell Res.* 248:457-472.

Lain S et al. 1999b. Accumulating active p53 in the nucleus by inhibition of nuclear export: a novel strategy to promote the p53 tumor suppressor function *Exp Cell Res.* 253:315.

Muller PA et al. 2009 Nuclear-cytosolic transport of COMMD1 regulates NF-kappaB and HIF-1 activity. *Traffic* 10(5):514-27.

Mutka S 2007 Nuclear Export Inhibitors (NEIs) as novel cancer therapies AACR Annual Meeting. Poster 5609.

Mutka S, Yang W, Dong S, et al. 2009. Identification of nuclear export inhibitors with potent anticancer activity in vivo. *Cancer Res.* 69: 510-7.

Nakahara J et al. 2009. Abnormal expression of TIP30 and arrested nucleocytoplasmic transport within oligodendrocyte precursor cells in multiple sclerosis *J Clin Invest.* 119:169-181.

Noske A et al. 2008. Expression of the nuclear export protein chromosomal region maintenance/exportin 1/Xpo1 is a prognostic factor in human ovarian cancer. *Cancer.* 112:1733-1743.

Pollard V & Malim M. 1998 The HIV-1 Rev protein *Annu Rev Microbiol* 52:491-532.

Rawlinson S, Pryor M, Wright P, Jans D 2009 CRM1-mediated nuclear export of dengue virus RNA polymerase NS5 modulates interleukin-8 induction and virus production. *J Biol Chem* 284(23):15589-97.

Sanchez V, Mahr J, Orazio N, et al 2007 Nuclear export of the human cytomegalovirus tegument protein pp65 requires cyclin-dependent kinase activity and the Crm1 exporter. *J Virol* 81(21):11730-6..

Sorokin AV et al. 2007. Nucleocytoplasmic transport of proteins . *Biochemistry* 72:1439-1457.

Terry LJ et al. 2007. Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science* 318:1412-1416.

Van der Watt PJ et al. 2008. The Karyopherin proteins, Crm1 and Karyopherin beta1, are overexpressed in cervical cancer and are critical for cancer cell survival and proliferation. *Int J Canc.* 124:1829-1840.

Walsh MD et al. 2008 Exportin 1 inhibition attenuates nuclear factor-kappaB-dependent gene expression. *Shock* 29:160-166.

Williams P, Verhagen J, Elliott G 2008 Characterization of a CRM1-dependent nuclear export signal in the C terminus of herpes simplex virus type 1 tegument protein UL47. *J Virol* 82(21):10946-52.

Yang W 2007 Anti-tumor activity of novel nuclear export inhibitors (NEIs) in multiple murine leukemia models. AACR Annual Meeting. Poster 5597.

Yao Y et al. 2009. The expression of CRM1 is associated with prognosis in human osteosarcoma. *Oncol Rep.* 21:229-35.

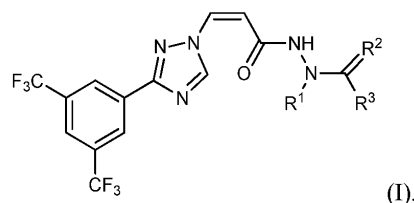
Zimmerman TL et al 2006 Nuclear export of retinoid X receptor alpha in response to interleukin-1beta-mediated cell signaling: roles for JNK and SER260. *J Biol Chem* 281:15434-15440.

Раскрытия всех процитированных в настоящем документе патентов, опубликованных заявок и ссылок полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Наряду с тем, что настоящее изобретение было конкретно представлено и описано со ссылками на его иллюстративные варианты осуществления, специалистам в настоящей области техники будет понятно, что различные изменения в форме и деталях можно осуществить в них, не отклоняясь от объема настоящего изобретения, представленного в прилагаемой формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы I



(I),

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или гидрат, где

R¹ выбран из водорода и C₁-C₄ алкила;

R² выбран из O и S;

R³ выбран из -N(R⁴)-(C₃-C₆ циклоалкила), -C₁-C₆ алкила, -(C₀-C₄ алкилен)гетероциклила, -(C₀-C₄ алкилен)гетероарила и замещенного R³, причем

в указанном замещенном R³ любая гетероарильная часть R³ независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -OH, -SH, нитро, галогена, amino, циано, C₁-C₁₂ алкила, C₂-C₁₂ алкенила, C₂-C₁₂ алкинила, C₁-C₁₂ алкокси, C₁-C₁₂ галоалкила, C₁-C₁₂ галоалкокси и C₁-C₁₂ алкилсульфанила; и

в указанном замещенном R³ любая алкильная, алкиленовая или гетероциклильная часть R³ независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из оксо, -OH, -SH, нитро, галогена, amino, циано, C₁-C₁₂ алкила, C₂-C₁₂ алкенила, C₂-C₁₂ алкинила, C₁-C₁₂ алкокси, C₁-C₁₂ галоалкила, C₁-C₁₂ галоалкокси и C₁-C₁₂ алкилсульфанила; и

R⁴ выбран из водорода и C₁-C₄ алкила, причем

гетероарил представляет собой 5-6-членное арильное кольцо, содержащее от одного до трех гетероатомов, независимо выбранных из O, S или N, и

гетероциклил представляет собой моноциклическое, слитое бициклическое, соединенное мостиком бициклическое, спиробициклическое или полициклическое 4-13-членное насыщенное или ненасыщенное алифатическое кольцо, содержащее 1, 2, 3, 4 или 5 гетероатомов, независимо выбранных из N, O или S.

2. Соединение по п.1, где

R² представляет собой O;

R^3 выбран из $-C_1-C_6$ алкила, $-(C_0-C_4 \text{ алкилен})\text{гетероциклила}$, $-(C_0-C_4 \text{ алкилен})\text{гетероарила}$ и замещенного R^3 ; причем

в указанном замещенном R^3 любая алкильная, алкиленовая или гетероциклильная часть R^3 независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из оксо, $-OH$, $-SH$, нитро, галогена, amino, циано, C_1-C_{12} алкила, C_2-C_{12} алкенила, C_2-C_{12} алкинила, C_1-C_{12} алкокси, C_1-C_{12} галоалкила, C_1-C_{12} галоалкокси и C_1-C_{12} алкилсульфанила;

в указанном замещенном R^3 любая гетероарильная часть R^3 независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из $-OH$, $-SH$, нитро, галогена, amino, циано, C_1-C_{12} алкила, C_2-C_{12} алкенила, C_2-C_{12} алкинила, C_1-C_{12} алкокси, C_1-C_{12} галоалкила, C_1-C_{12} галоалкокси и C_1-C_{12} алкилсульфанила;

гетероарил представляет собой 5-6-членное арильное кольцо, содержащее от одного до трех гетероатомов, независимо выбранных из O, S или N, и

гетероциклил представляет собой моноциклическое, слитое бициклическое, соединенное мостиком бициклическое, спиробициклическое или полициклическое 4-13-членное насыщенное или ненасыщенное алифатическое кольцо, содержащее 1, 2, 3, 4 или 5 гетероатомов, независимо выбранных из N, O или S.

3. Соединение по п.1, где

R^1 выбран из водорода и C_1-C_4 алкила;

R^2 представляет собой O и

R^3 представляет собой $-C_1-C_6$ алкил или указанный замещенный R^3 , причем в указанном замещенном R^3 R^3 независимо замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из $-OH$, $-SH$, нитро, галогена, amino, циано, C_1-C_{12} алкила, C_2-C_{12} алкенильной или C_2-C_{12} алкинильной группы, C_1-C_{12} алкокси, C_1-C_{12} галоалкила, C_1-C_{12} галоалкокси и C_1-C_{12} алкилсульфанила.

4. Соединение по пп.1, 2 или 3, где R^1 выбран из водорода и метила.

5. Соединение по п.4, где R^1 представляет собой водород.

6. Соединение по п.1, где R^2 представляет собой O.

7. Соединение по п.1, где R^4 представляет собой водород.

8. Соединение по п.1, где R^3 выбран из $-N(R^4)-(C_3-C_6 \text{ циклоалкила})$, $-C_3-C_6$ алкила, $-(C_0-C_1 \text{ алкилен})\text{гетероциклила}$, $-(C_0-C_1 \text{ алкилен})\text{гетероарила}$ и замещенного R^3 , причем

в указанном замещенном R^3 любая алкильная или алкиленовая часть R^3 независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из оксо и $-N(R^5)_2$, где каждый R^5 независимо выбран из водорода и C_1-C_4 алкила;

любая гетероциклильная часть R^3 содержит по меньшей мере один атом азота в кольце, и указанный замещенный R^3 замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из C_1-C_4 алкила и оксо; и

любая гетероарильная часть R^3 содержит по меньшей мере один атом азота в кольце, и указанный замещенный R^3 замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из C_1-C_4 алкилами.

9. Соединение по п.2, в котором R^3 выбран из $-C_3-C_6$ алкила, $-(C_0-C_1 \text{ алкилен})\text{гетероциклила}$, $-(C_0-C_1 \text{ алкилен})\text{гетероарила}$ и замещенного R^3 ; причем

в указанном замещенном R^3 любая алкильная или алкиленовая часть R^3 независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из оксо и $-N(R^5)_2$, где каждый R^5 независимо выбран из водорода и C_1-C_4 алкила;

любая гетероциклильная часть R^3 содержит по меньшей мере один атом азота в кольце, и указанный замещенный R^3 замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из C_1-C_4 алкила и оксо; и

любая гетероарильная часть R^3 содержит по меньшей мере один атом азота в кольце, и указанный замещенный R^3 замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из C_1-C_4 алкилами.

10. Соединение по п.3, где R^3 представляет собой $-C_3-C_6$ алкил.

11. Соединение по любому из пп.8 или 9, в котором R^3 представляет собой $-(C_0-C_1 \text{ алкилен})\text{гетероциклил}$.

12. Соединение по п.11, где R^3 представляет собой $-(C_1 \text{ алкилен})\text{гетероциклил}$.

13. Соединение по п.12, где гетероциклил выбран из пирозина, пиперидина, морфолина и пирозолина.

14. Соединение по п.13, где гетероциклил представляет собой морфолин.

15. Соединение по любому из пп.1 или 2, где любая алкильная, алкиленовая, гетероциклильная и гетероарильная часть указанного замещенного R^3 независимо замещена аминогруппой, характеризующейся формулой $-N(R^5)_2$, где каждый R^5 независимо выбран из водорода и C_1-C_4 алкила.

16. Соединение по п.3, в котором R^3 независимо замещен аминогруппой, характеризующейся формулой $-N(R^5)_2$, где каждый R^5 независимо выбран из водорода и C_1-C_4 алкила.

17. Соединение по п.1, где R^3 выбран из $-N(R^4)-(C_3-C_6 \text{ циклоалкила})$, $-C_3-C_6$ алкила, $-(C_0-C_1 \text{ алкилен})\text{гетероциклила}$, $-(C_0-C_1 \text{ алкилен})\text{гетероарила}$ и замещенного R^3 , причем

в указанном замещенном R^3 любая алкильная или алкиленовая часть R^3 замещена $-N(R^5)_2$, где каждый R^5 независимо выбран из водорода и C_1-C_4 алкила;

в указанном замещенном R^3 любая гетероциклическая и гетероарильная часть R^3 содержит по меньшей мере один атом азота в кольце; и

в указанном замещенном R^3 любая гетероциклическая и гетероарильная часть R^3 замещена C_1 - C_4 алкилом.

18. Соединение по п.2, где R^3 выбран из $-N(R^4)-(C_3-C_6$ циклоалкила), $-C_3-C_6$ алкила, $-(C_0-C_1$ алкилен)гетероцикла, $-(C_0-C_1$ алкилен)гетероарила и замещенного R^3 , причем

в указанном замещенном R^3 любая алкильная или алкиленовая часть R^3 замещена $-N(R^5)_2$, где каждый R^5 независимо выбран из водорода и C_1 - C_4 алкила;

в указанном замещенном R^3 любая гетероциклическая и гетероарильная часть R^3 содержит по меньшей мере один атом азота в кольце; и

в указанном замещенном R^3 любая гетероциклическая и гетероарильная часть R^3 замещена C_1 - C_4 алкилом.

19. Соединение по любому из пп.1 или 2, где R^3 выбран из $-C(CH_3)_3$, $-CH(NH_2)-CH(CH_3)_2$, $-NH$ -циклопропила, $-(CH_2)_{0-1}$ -пиазинила, пиперидинила, гидроксипиперидинила, N -метилпиперидинила, $-CH_2$ -морфолин-4-ила и метилпиазолила.

20. Соединение по п.19, где R^3 выбран из $-C(CH_3)_3$, $-CH(NH_2)-CH(CH_3)_2$, $-NH$ -циклопропила, $-(CH_2)_{0-1}$ -пиазин-2-ила, пиперидин-3-ила, $-CH_2$ -морфолин-4-ила и 5-метил-1- H -пиазол-4-ила.

21. Соединение по п.20, где R^3 выбран из $-C(CH_3)_3$, $-NH$ -циклопропила, $-CH_2$ -пиазин-2-ила, $-пиазин-2-ила$, $-CH_2$ -морфолин-4-ила и 5-метил-1- H -пиазол-4-ила.

22. Соединение по п.3, в котором R^3 представляет собой $-C(CH_3)_3$.

23. Соединение, представленное любой из структурных формул, изложенных ниже:

№ соединения	Структура соединения	№ соединения	Структура соединения
1		9	
2		10	
3		11	
4		12	
5		13	
6		14	
7		15	
8			

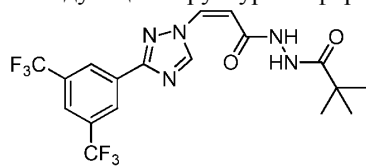
или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или гидрат.

24. Соединение по п.23, выбранное из любого одного из соединений 1, 2, 3, 4, 8, 11, 12 и 13, представленных следующими структурными формулами:

№ соединения	Структура соединения	№ соединения	Структура соединения
1		11	
2		12	
3		13	
4		8	

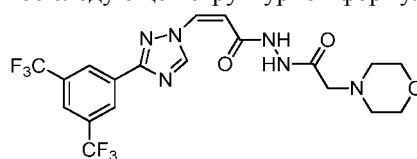
или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или гидрат.

25. Соединение, представленное следующей структурной формулой:



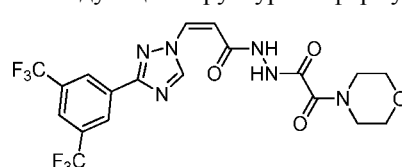
или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или гидрат.

26. Соединение, представленное следующей структурной формулой:



или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или гидрат.

27. Соединение, представленное следующей структурной формулой:



или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или гидрат.

28. Фармацевтическая композиция для лечения связанного с активностью CRM1 нарушения, содержащая соединение по любому из пп.1-27 или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или гидрат и фармацевтически приемлемый носитель.

29. Способ лечения связанного с активностью CRM1 нарушения, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-27, где нарушение выбрано из пролиферативного нарушения, ангиогенеза, воспалительного нарушения, аутоиммунного нарушения, вирусной инфекции, раны, офтальмологического нарушения, нейродегенеративного нарушения, нарушения аномального роста ткани, связанного с приемом пищи нарушения, аллергий, респираторного нарушения, острого нарушения мозгового кровообращения и травматического повреждения головного мозга.

30. Способ по п.29, при котором нарушение представляет собой рак.

31. Способ по п.30, при котором рак представляет собой гематологическую злокачественную опухоль.

32. Способ по п.31, при котором гематологическая злокачественная опухоль выбрана из лейкоза, лимфомы или миеломы.

33. Способ по п.32, при котором гематологическая злокачественная опухоль представляет собой миелому.

34. Способ по п.33, при котором миелома представляет собой множественную миелому.

35. Способ по п.31, при котором гематологическая злокачественная опухоль представляет собой лейкоз.

36. Способ по п.35, при котором лейкоз выбран из острого миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелогенного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза и волосатоклеточного лейкоза.

37. Способ по п.31, при котором рак представляет собой лимфому.

38. Способ по п.37, при котором лимфома представляет собой неходжкинскую лимфому.

39. Способ по п.37, при котором лимфома выбрана из кожной Т-клеточной лимфомы, лимфомы Беркита, лимфомы из клеток мантийной зоны и диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы.

40. Способ по п.30, при котором рак представляет собой солидную опухоль.

41. Способ по п.40, при котором солидная опухоль выбрана из опухоли предстательной железы, молочной железы, легких, толстого кишечника, поджелудочной железы, почки, яичника, печени, яичка, глотки, костей и мозга.

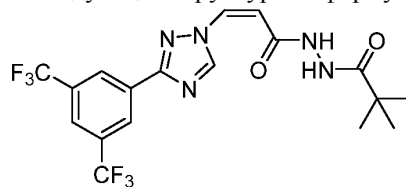
42. Способ по п.29, при котором нарушение выбрано из ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, синдрома раздраженного кишечника, болезни Крона, слизистого колита, язвенного колита, гастрита, экземы, атопического дерматита, контактного дерматита, крапивницы, склеродермии, пузырчатки, пемфигоида, аллергического дерматита, гематологической злокачественной опухоли, лейкоза, миеломы, неходжкинской лимфомы, кожной Т-клеточной лимфомы, лимфомы Беркита, лимфомы из клеток мантийной зоны, фиброза, включая расширяющуюся кардиомиопатию, гипертрофическую кардиомиопатию, рестриктивную кардиомиопатию, фиброз легких, фиброз печени, гломерулонефрит, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, солидной опухоли, опухоли мягких тканей, саркомы, аденокарциномы и карциномы.

43. Способ лечения нарушения, выбранного из красной волчанки, рассеянного склероза и амиотрофического латерального склероза, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-27.

44. Способ по любому из пп.29-43, при котором соединение вводят перорально, парентерально, с помощью спрея для ингаляции, местно, ректально, назально, буккально, вагинально или посредством имплантированной емкости.

45. Способ по п.43, при котором соединение вводят перорально.

46. Способ лечения красной волчанки, рассеянного склероза и амиотрофического латерального склероза, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества соединения, представленного следующей структурной формулой:



или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата или гидрата.

47. Способ по п.46, при котором нарушение представляет собой красную волчанку.

48. Способ по п.46, при котором нарушение представляет собой рассеянный склероз.

49. Способ по п.46, при котором нарушение представляет собой амиотрофический латеральный склероз.

50. Способ по пп.46-49, при котором соединение вводят перорально.

51. Способ по п.29, при котором нарушение представляет собой артрит.

52. Способ по п.51, при котором артрит представляет собой ревматоидный артрит.

53. Способ по п.29, при котором нарушение представляет собой псориаз.

54. Способ по п.29, при котором нарушение представляет собой ожирение.

55. Способ стимуляции заживления раны у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-27.

56. Способ по п.55, при котором рана представляет собой поверхностную рану, операционную рану, внутреннюю рану, хроническую рану, язву, ожог или результат воздействия ионизирующего излучения.

57. Способ по п.55, при котором рана выбрана из группы, состоящей из ожоговой раны, резаной раны, открытой раны, операционной или послеоперационной раны, диабетического поражения, термического ожога, химического ожога, лучевого ожога, намина, пролежня и состояния, связанного с диабетом или плохим кровообращением.

58. Способ лечения нейродегенеративного заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-27, где нейродегенеративное заболевание выбрано из болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера и болезни Хантингтона.

59. Способ лечения вирусной инфекции, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-27, где вирусная инфекция вы-

звана вирусным патогеном, выбранным из аденовируса, вируса Коксаки, вируса энцефалита, вируса Эпштейна-Барра, вируса гепатита А, вируса гепатита В, вируса гепатита С, вируса простого герпеса 1 типа, вируса простого герпеса 2 типа, цитомегаловируса, вируса герпеса человека 8 типа, вируса иммунодефицита человека, вируса гриппа, вируса кори, вируса паротита, папилломавируса человека, вируса парагриппа, вируса полиомиелита, вируса бешенства, респираторно-синцитиального вируса, вируса краснухи, вируса ветряной оспы, вируса лихорадки Западного Нила, вируса денге и вируса желтой лихорадки.

60. Способ лечения воспалительного нарушения, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-27, где воспалительное нарушение выбрано из воспалительного заболевания кишечника, синдрома раздраженного кишечника, болезни Крона, слизистого колита, язвенного колита, гастрита, экземы, атопического дерматита, контактного дерматита, крапивницы, склеродермии, пузырчатки, пемфигоида, аллергического дерматита.

61. Перорально приемлемая лекарственная форма, содержащая соединение или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или гидрат по любому из пп.1-27 и фармацевтически приемлемый носитель.

62. Перорально приемлемая лекарственная форма по п.61, где перорально приемлемая лекарственная форма представляет собой капсулу, таблетку, леденец, пастилку, водную суспензию, микроинкапсулированную форму или водный раствор.

63. Перорально приемлемая лекарственная форма по любому из пп.61, 62, где перорально приемлемая лекарственная форма включает лекарственную форму для немедленного высвобождения.

64. Перорально приемлемая лекарственная форма по любому из пп.61, 62, где перорально приемлемая лекарственная форма включает лекарственную форму для пролонгированного высвобождения.

65. Перорально приемлемая лекарственная форма по любому из пп.61, 62, где перорально приемлемая лекарственная форма включает лекарственную форму для замедленного высвобождения.

66. Применение перорально приемлемой лекарственной формы по любому из пп.61-65 для лечения нарушения, выбранного из пролиферативного нарушения, ангиогенеза, воспалительного нарушения, аутоиммунного нарушения, вирусной инфекции, раны, офтальмологического нарушения, нейродегенеративного нарушения, нарушения аномального роста ткани, связанного с приемом пищи нарушения, аллергий, острого нарушения мозгового кровообращения, травматического повреждения головного мозга и респираторного нарушения.

67. Применение по п.66, где нарушение выбрано из красной волчанки, рассеянного склероза и амиотрофического латерального склероза.

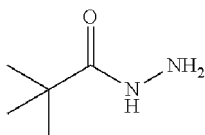
68. Применение по п.66, где нарушение представляет собой красную волчанку.

69. Применение по п.66, где нарушение представляет собой рассеянный склероз.

70. Применение по п.66, где нарушение представляет собой амиотрофический латеральный склероз.

71. Применение по п.66, где нарушение представляет собой рак.

72. Способ синтеза (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)-N'-пивалоилакрилогидразида, включающий приведение в реакцию (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)акриловой кислоты и пивалогидазида, имеющего формулу



73. Способ по п.72, где (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)акриловую кислоту получают приведением в реакцию (Z)-изопропил 3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)акрилата с LiOH.

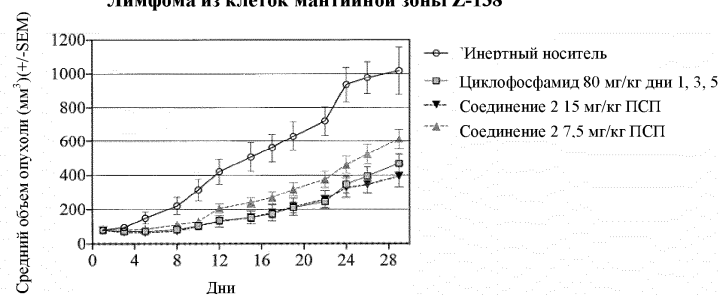
74. Способ по п.73, где (Z)-изопропил 3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)акрилат получают приведением в реакцию 3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазола с (Z)-изопропил 3-йодакрилатом.

75. Способ по п.74, где 3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазол получают приведением в реакцию 3,5-бис(трифторметил)бензотиоамида с гидратом гидразина.

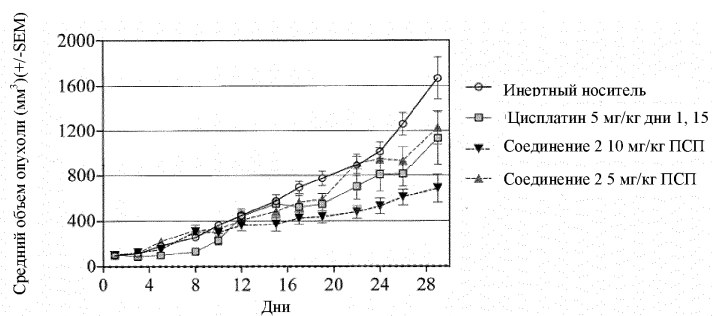
76. Способ по п.75, где 3,5-бис(трифторметил)бензотиоамид получают приведением в реакцию 3,5-бис(трифторметил)бензонитрила с сульфгидратом натрия.

77. Способ синтеза (Z)-3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)акриловой кислоты, включающий приведение в реакцию (Z)-изопропил 3-(3-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)акрилата с LiOH.

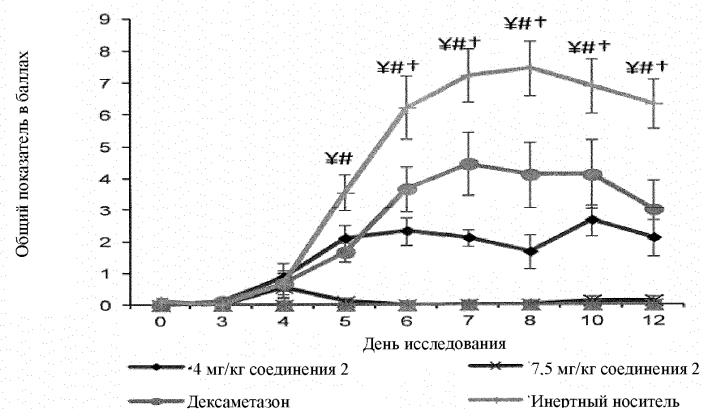
Лимфома из клеток мантийной зоны Z-138



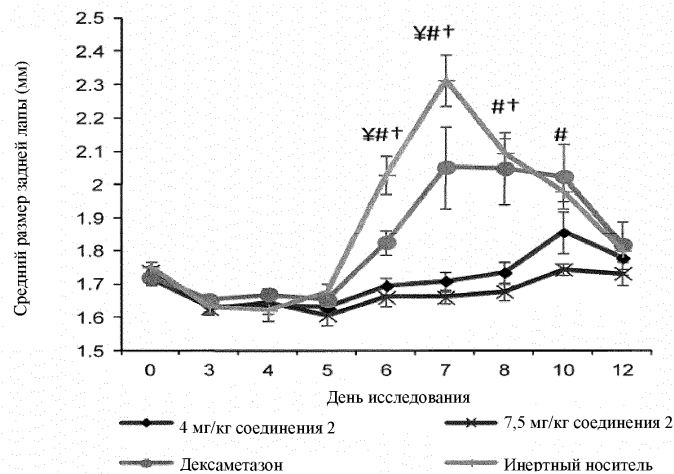
Фиг. 1



Фиг. 2



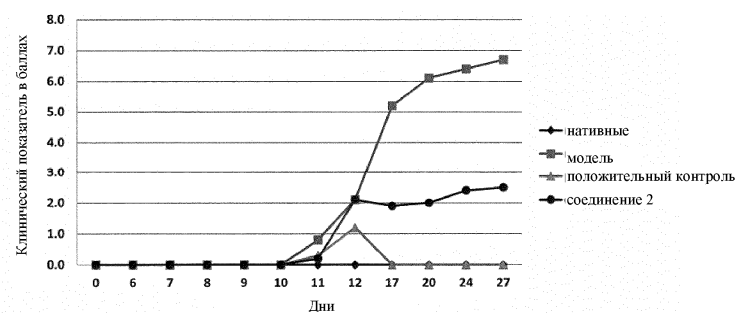
Фиг. 3А



Фиг. 3В

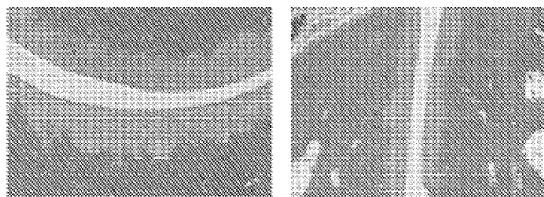


Фиг. 4А

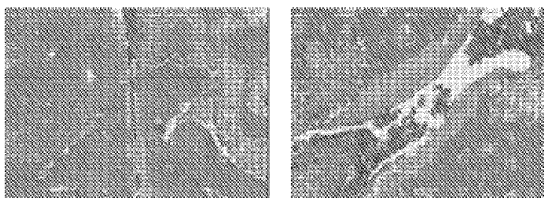


Фиг. 4В

А) нативные



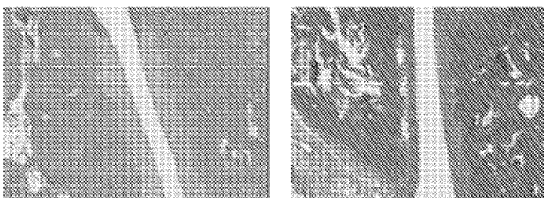
В) модель



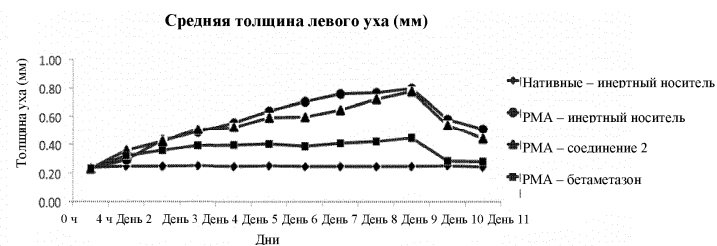
С) положительный контроль



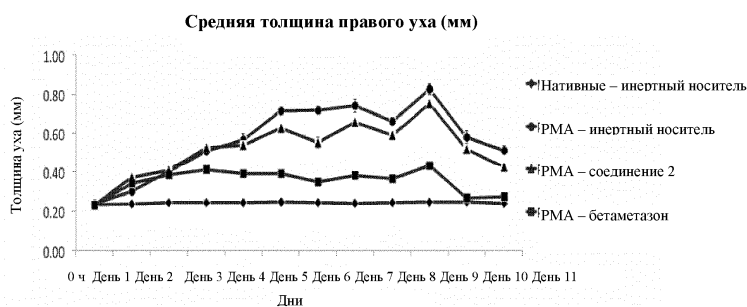
D) соединение 2



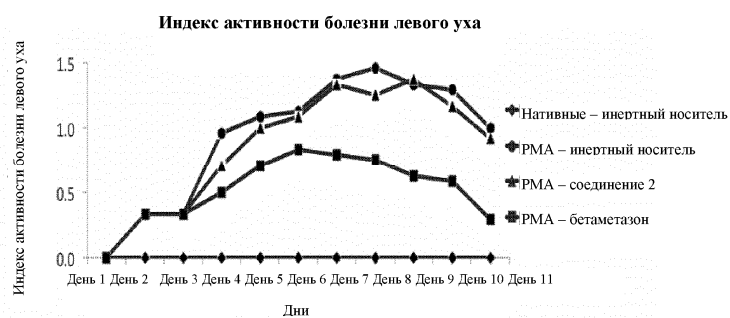
Фиг. 5



Фиг. 6А



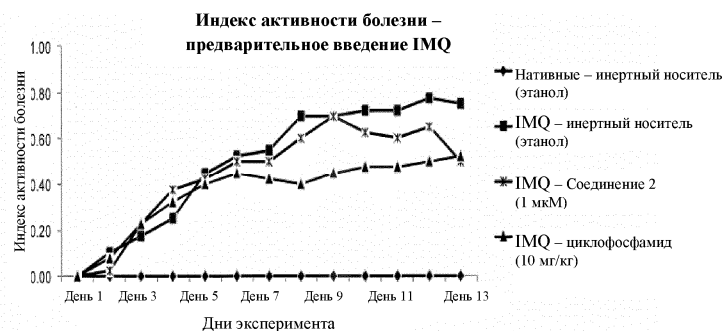
Фиг. 6В



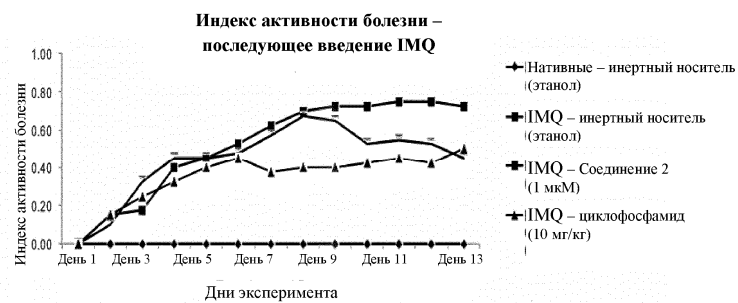
Фиг. 6С



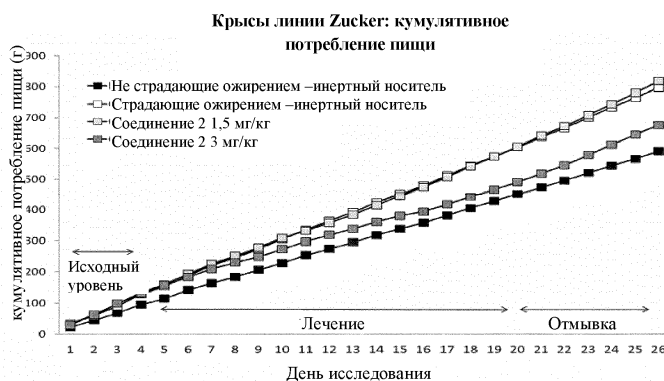
Фиг. 6D



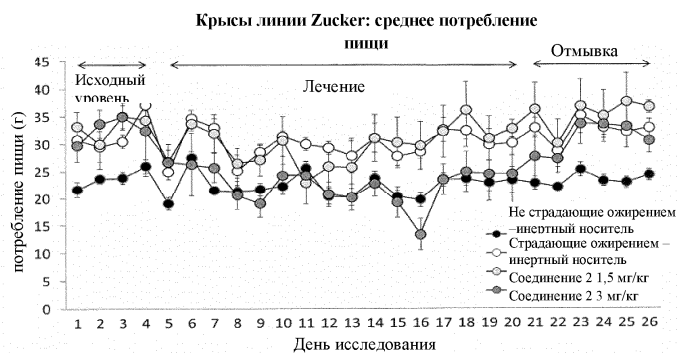
Фиг. 7А



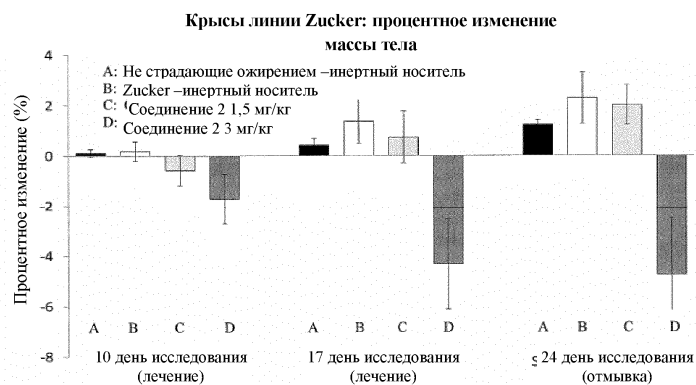
Фиг. 7В



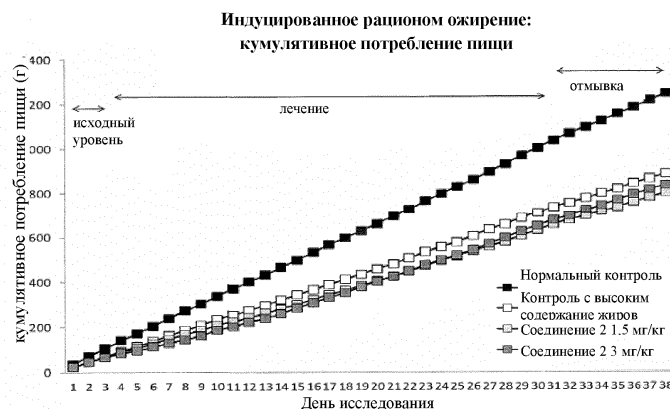
Фиг. 8А



Фиг. 8В



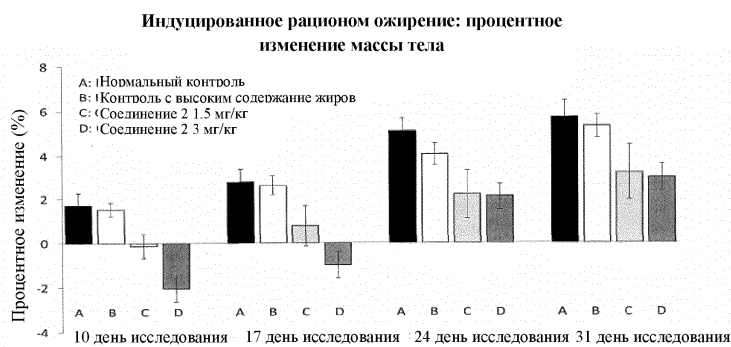
Фиг. 9



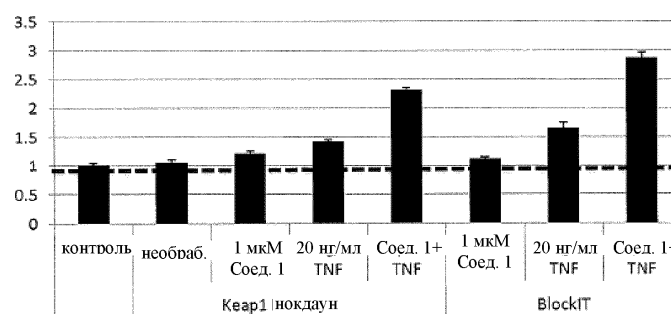
Фиг. 10А



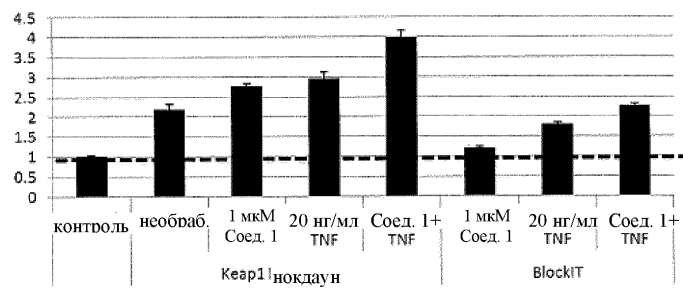
Фиг. 10В



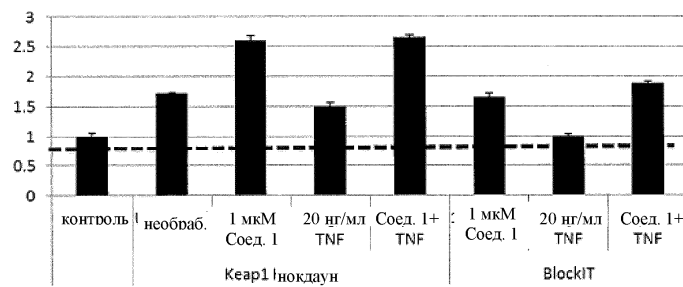
Фиг. 11



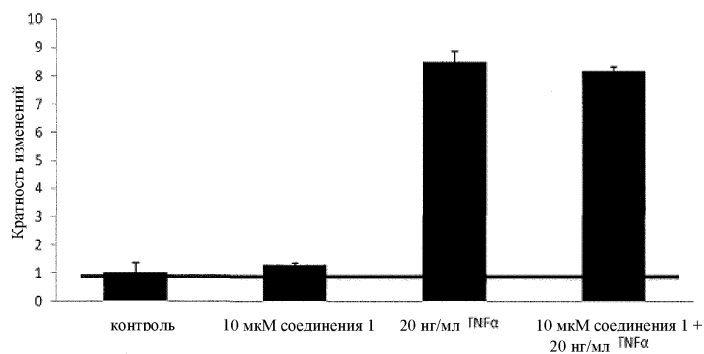
Фиг. 12А



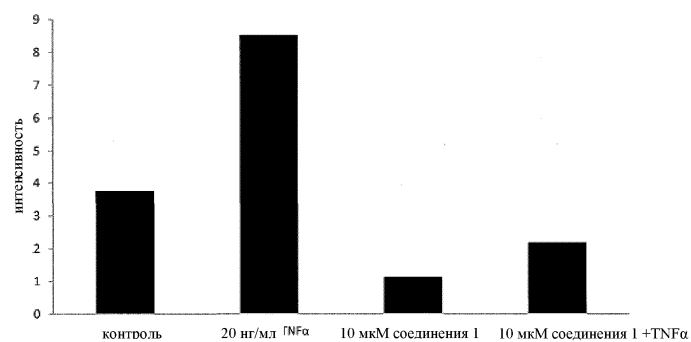
Фиг. 12В



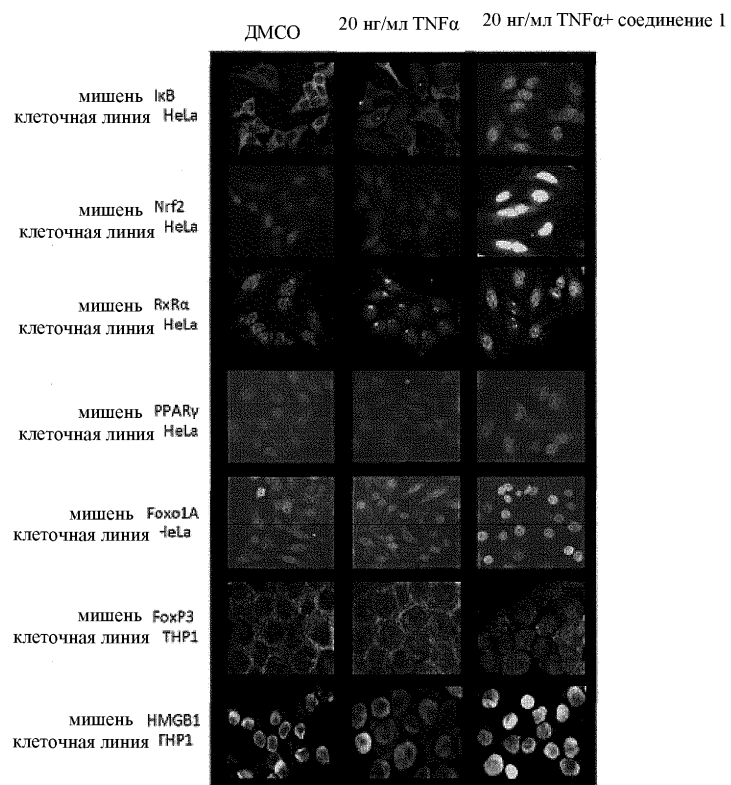
Фиг. 12С



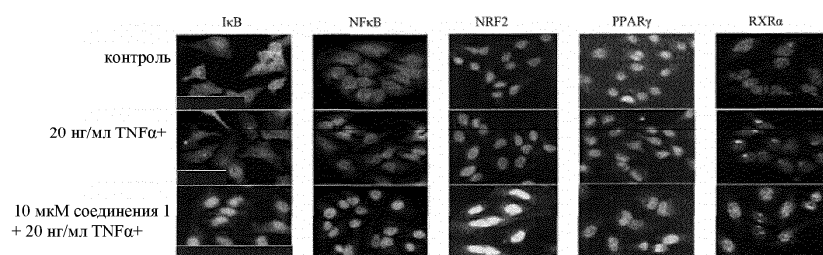
Фиг. 13А



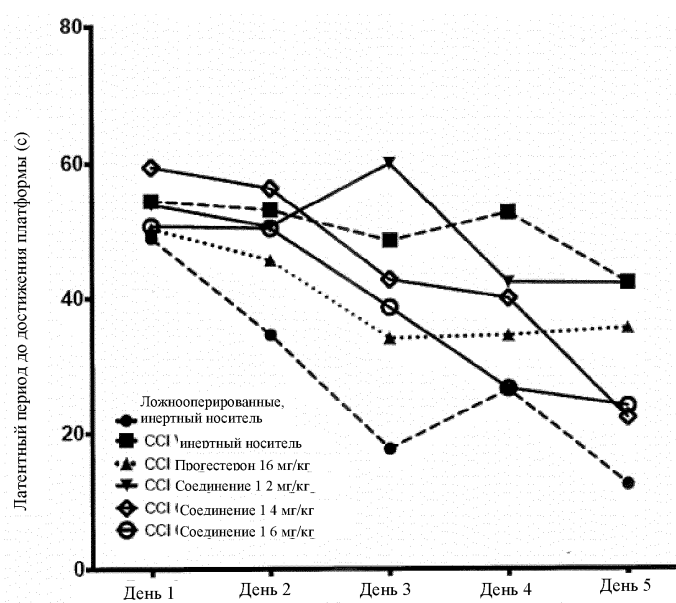
Фиг. 13В



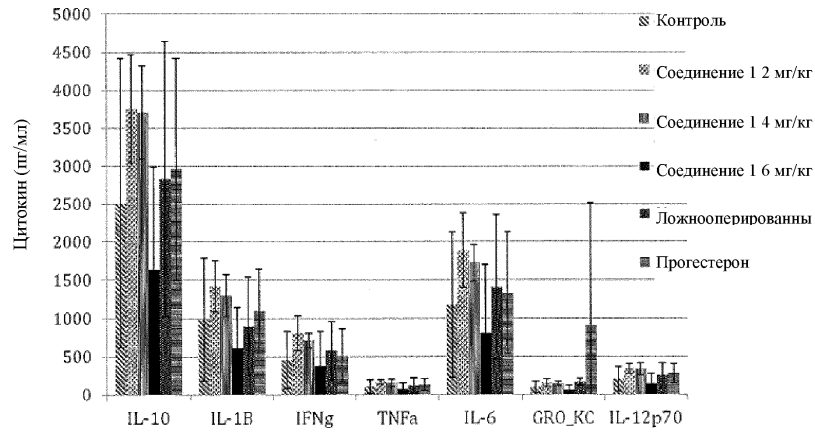
Фиг. 14А



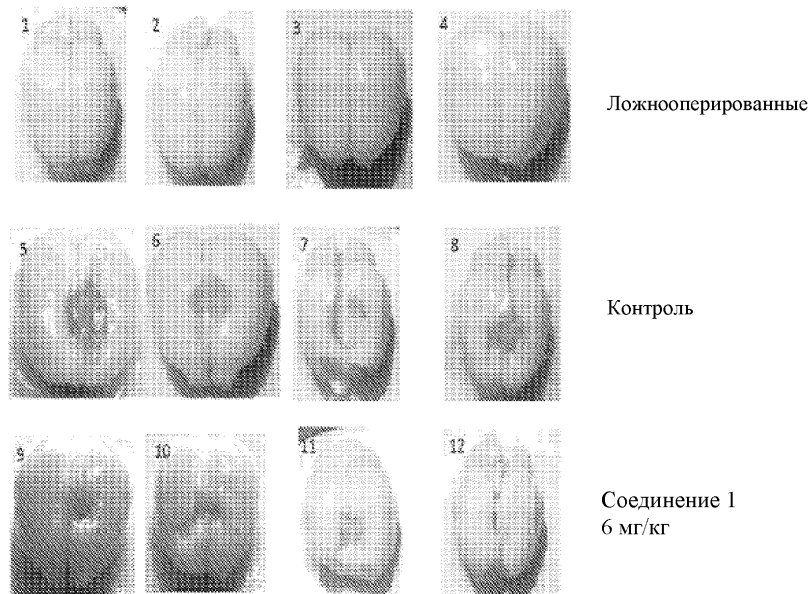
Фиг. 14В



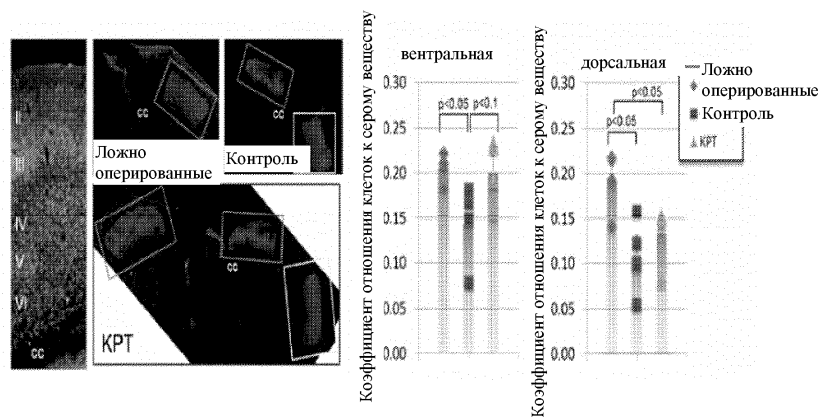
Фиг. 15А



Фиг. 15В

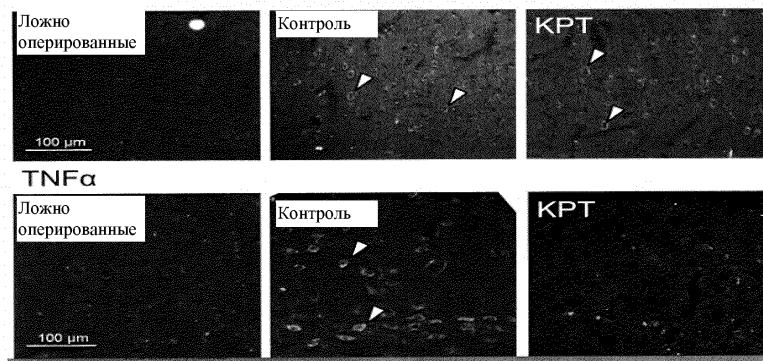


Фиг. 15С

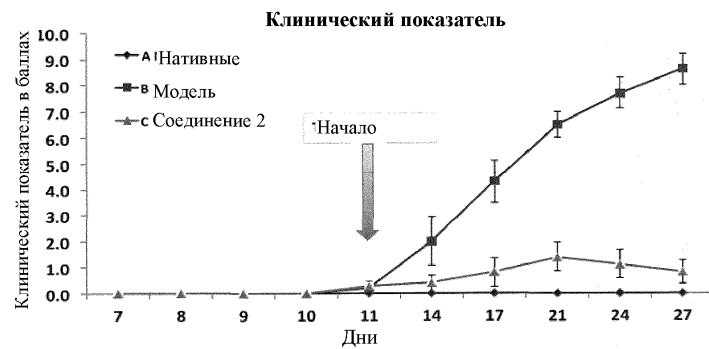


Фиг. 15D

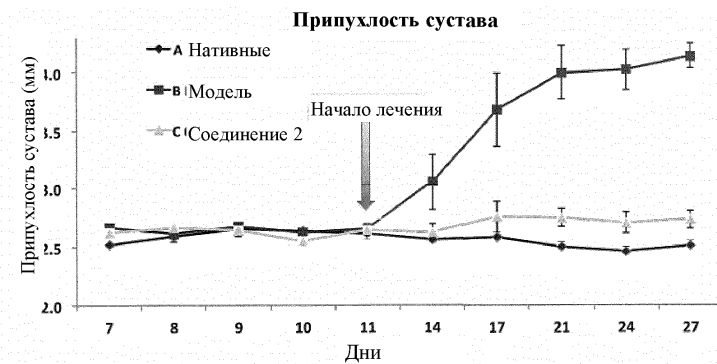
IgG крысы



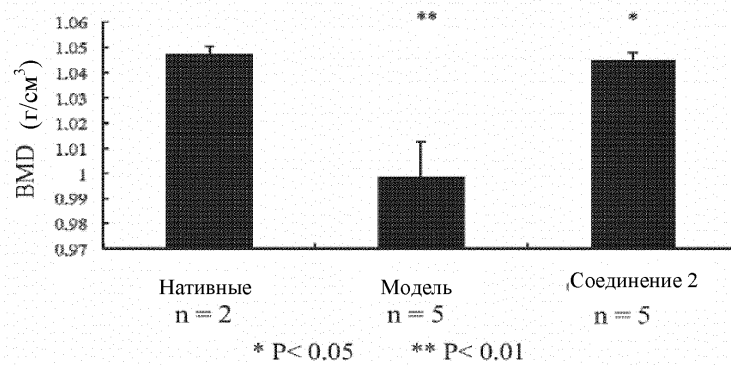
Фиг. 15E



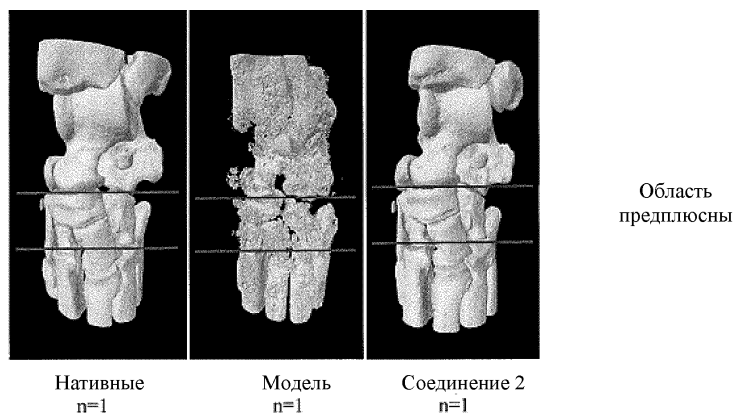
Фиг. 16A



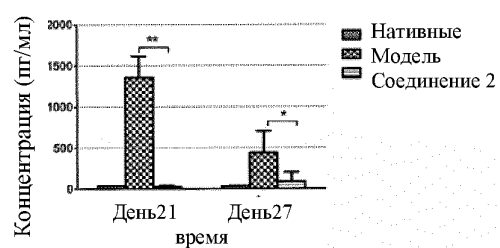
Фиг. 16B



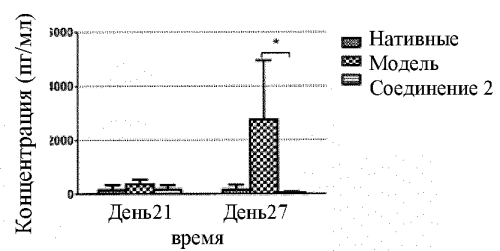
Фиг. 17A



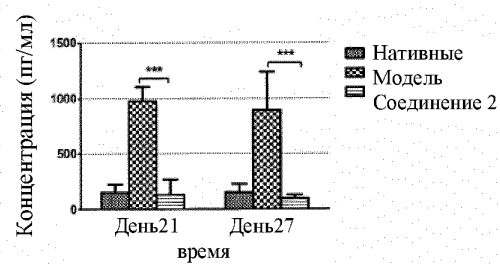
Фиг. 17В



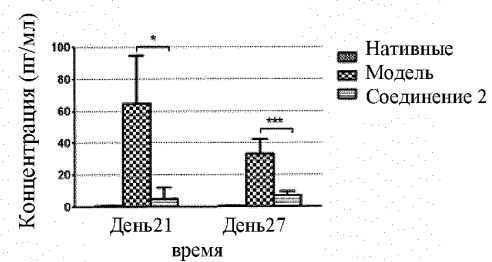
Фиг. 17С



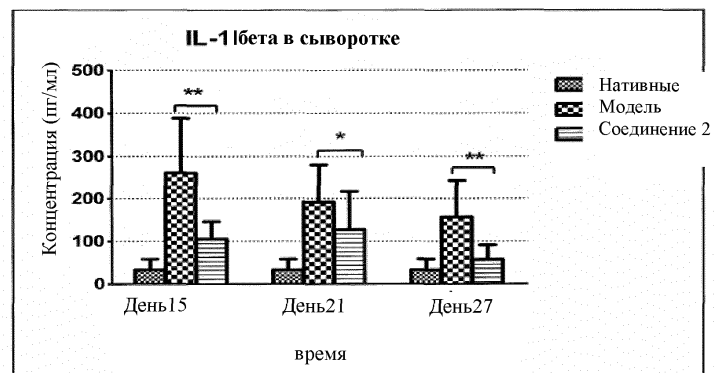
Фиг. 17D



Фиг. 17Е



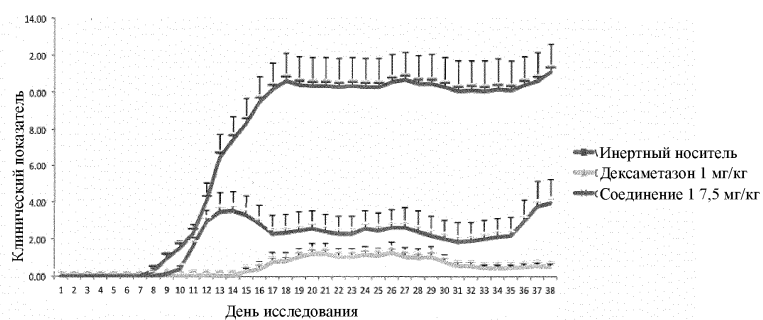
Фиг. 17F



Фиг. 17G



Фиг. 18А



Фиг. 18В

Морфология ран через 5 дней после нанесения ран

Местное введение на раны

Контроль, вода
местно



Соединение 1 2,5
мкМ местно



Соединение 1 1 мкМ
местно ежедневно



Системное введение – пероральный зонд

Контроль перорально
PVP/Pluronic



Соединение 1 4 мг/кг
перорально, через
день



Соединение 1 7,5
мг/кг перорально,
через день



Фиг. 19



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2