

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191239** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.09.21

(22) Дата подачи заявки
2019.12.13

(51) Int. Cl. *C07D 239/36* (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 11/08 (2006.01)

(54) **СОЕДИНЕНИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДЕФИЦИТА
 α_1 -АНТИТРИПСИНА**

(31) **1820450.3**

(32) **2018.12.14**

(33) **GB**

(86) **PCT/GB2019/053552**

(87) **WO 2020/120992 2020.06.18**

(71) Заявитель:
3 ФАКТОР ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
**Рамсен Найджел, Фокс Дэвид Джон,
Хантингтон Джеймс Эндрю (GB)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к производным оксопиримидинилметилбензамида, например, в форме фармацевтически приемлемой соли или кристаллической формы, фармацевтическим композициям, содержащим указанные производные, и их медицинскому применению, в частности для лечения недостаточности α_1 -антитрипсина (A1AD или AATD).

202191239
A1

202191239

A1

СОЕДИНЕНИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДЕФИЦИТА α_1 -АНТИТРИПСИНА

Изобретение относится к N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамиду и родственным соединениям, а также их медицинскому применению.

5 α_1 -Антитрипсин (A1AT) является членом суперсемейства серпинов, продуцируемых печенью и секретируемых в кровь. Он ингибирует множество сериновых протеаз, особенно эластазу нейтрофилов. Когда уровень A1AT в крови низкий, чрезмерная активность эластазы нейтрофилов приводит к разрушению легочной ткани, что приводит к респираторным осложнениям, таким как хроническая обструктивная болезнь легких
10 (ХОБЛ).

Диапазон референсных значений A1AT в крови составляет 0,9–2,3 г/л. Уровень ниже этого значения типичен для дефицита α_1 -антитрипсина – генетического нарушения, вызванного мутациями в гене SERPINA1, кодирующем A1AT. Мутация Z, наиболее частая причина дефицита α_1 -антитрипсина, представляет собой замену глутамата на лизин в
15 положении 366 A1AT (UniProtKB - P01009 (A1AT_HUMAN)), соответствующем положению 342 в зрелом белке (Z A1AT). Мутация Z влияет на сворачивание A1AT, в результате чего только небольшая фракция переходит в нативное/активное состояние. Остальная часть либо выводится как неправильно упакованный белок, либо накапливается в печени в виде стабильных полимеров. Из-за неправильной укладки гомозиготные
20 носители мутации Z (ZZ) имеют уровень A1AT в плазме, который составляет 10-15% от нормального, что предрасполагает к развитию у них ХОБЛ. Накопление полимеров Z A1AT в клетках печени предрасполагает носителей к циррозу, раку печени и другим патологиям печени.

Современное лечение легочных проявлений дефицита α_1 -антитрипсина включает
25 аугментационную терапию с применением концентратов A1AT, приготовленных из плазмы доноров крови. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США одобрило применение четырех продуктов, содержащих A1AT: Проластин, Земайру, Глассию и Араласт. Дозирование осуществляется путем внутривенной инфузии один раз в неделю. Доказано, что аугментационная терапия
30 замедляет прогрессирование ХОБЛ. Печеночные проявления дефицита α_1 -антитрипсина (например, цирроз и рак) лечат стероидами и трансплантацией печени. Подходы к исследованию более эффективного лечения проявлений со стороны печени включают ингибирование полимеризации Z A1AT и увеличение клиренса полимеров за счет

активации аутофагии. Исследовательские подходы к более эффективному лечению проявлений как со стороны легких, так и печени, направлены на более полное сворачивание и секрецию Z A1AT.

5 Elliott *et al* (Protein Science, 2000, 9, 1274–1281) описали рентгеновскую кристаллическую структуру A1AT и идентифицировали пять полостей, которые являются потенциальными мишенями для рационального дизайна лекарств с целью разработки средств, влияющих на полимеризацию Z A1AT.

10 Parfrey *et al* (J. Biol. Chem., 2003, 278, 35, 33060–33066) дополнительно определили единственную полость, которая является потенциальной целью для рационального дизайна лекарств с целью разработки средств, влияющих на полимеризацию Z A1AT.

Knaupp *et al.* (J. Mol. Biol., 2010, 396, 375–383) показали, что бис-ANS (4,4'-дианилино-1,1'-бинафтил-5,5'-дисульфонат) способен связываться с Z A1AT, но не с A1AT (M) дикого типа, со стехиометрией 1:1 и Kd 700 нМ.

15 Chang и др. (J. Cell. Mol. Med., 2009, 13, 8B, 2304-2316) сообщили о серии пептидов, включая Ac-TTAI-NH₂, которые ингибируют полимеризацию Z A1AT.

Burrows *et al* (Proc. Nat. Acad. Sci., 2000, 97, 4, 1796–1801) показали, что ряд неселективных шаперонов, включая 4-фенилмасляную кислоту, глицерин и оксид триметиламина, способны увеличивать уровень Z A1AT в супернатантах клеток и на моделях мышей.

20 Bouchecareilh *et al.* (Journal of Biological Chemistry, 2012, 287, 45, 38265-38278) описывают применение ингибиторов гистондеацетилазы, в частности SAHA (субероиланилидгидроксамовая кислота), для увеличения секреции как дикого типа (M), так и Z A1AT из ячеек.

Berthelie et al (PLOS ONE, 11 мая 2015 г.) продемонстрировали, что S-(4-нитробензил)-6-тиогуанозин способен предотвращать полимеризацию Z A1AT *in vitro*.

Mallya *et al* (J. Med. Chem., 2007, 50, 22, 5357-5363) описывают ряд фенолов, таких как N-(4-гидрокси-3,5-диметилфенил)-2,5-диметилтиофен-3-сульфонамид, способных блокировать полимеризацию Z A1AT *in vitro*.

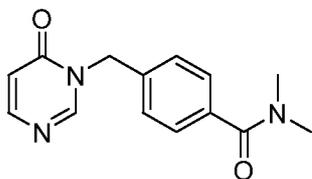
30 Huntington (XIIIth International Symposium on Proteinases, Inhibitors and Biological Control, 23 September 2012, and 7th International Symposium on Serpin Biology, Structure and Function, 1st April 2014) обсудил полость рентгеновской кристаллической структуры Z A1AT, которая

является потенциальной мишенью для рационального дизайна лекарств с целью разработки средств, влияющих на полимеризацию Z A1AT.

В патентной заявке США 8 436013B2 раскрывается широкий спектр структур, способных увеличивать секрецию Z A1AT клетками в микромолярном диапазоне.

- 5 Соединения с регистрационными номерами CAS 1797054-78-4 и 1219580-65-0 перечислены в каталоге Aurora Building Blocks.

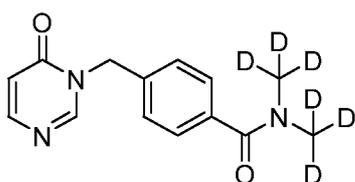
Согласно одному аспекту настоящего изобретения предлагается N, N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид:



- 10 Мы обнаружили, что N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид неожиданно оказался высокоэффективным в увеличении уровня правильно свернутого и, следовательно, активного Z A1AT, и в то же время он не влияет на секрецию A1AT дикого типа (M) или варианта A1AT Siiyama.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предложен

- 15 N,N-бис(метил-d3)-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид:



- Мы обнаружили, что N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид неожиданно оказался высокоэффективным в увеличении уровня правильно свернутого и, следовательно, активного Z A1AT, и в то же время он не влияет на секрецию A1AT дикого типа (M) или варианта A1AT Siiyama.

Соединение, предложенное в изобретении, может быть в форме фармацевтически приемлемой соли или в форме кристалла.

- 25 Термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к фармацевтически приемлемой моноорганической или неорганической соли соединения, представленного в изобретении.

Он может включать соли присоединения неорганических кислот, таких как гидрохлорид, гидробромид, гидроиодид, сульфат, фосфат, дифосфат и нитрат, или органических кислот, таких как ацетат, малеат, фумарат, тартрат, сукцинат, цитрат, лактат, метансульфонат, п-толуолсульфонат, пальмоат. и стеарат. Примеры солей также включают оксалат, хлорид, бромид, йодид, бисульфат, кислый фосфат, изоникотинат, салицилат, кислый цитрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, гентизинат, глюконат, глюкуронат, сахарат, формиат, бензоат, этаносульфат, глутамат, этансульфонат. и бензолсульфонатные соли. Другие примеры фармацевтически приемлемых солей можно посмотреть в Gould (1986, Int J Pharm 33: 201-217).

10 В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение изобретения, описанное в настоящем документе, и фармацевтически или терапевтически приемлемое вспомогательное вещество или носитель.

Термин «фармацевтически или терапевтически приемлемое вспомогательное вещество или носитель» относится к твердому или жидкому наполнителю, разбавителю или инкапсулирующему веществу, которое не влияет на эффективность или биологическую активность действующих веществ и которое не токсично для хозяина, которым может быть либо человек, либо животное, которому он вводится. В зависимости от конкретного способа введения можно использовать различные фармацевтически приемлемые носители, например, хорошо известные в данной области. Неограничивающие примеры включают сахара, крахмалы, целлюлозу и ее производные, мальтозу, желатин, тальк, сульфат кальция, растительные масла, синтетические масла, полиолы, альгиновую кислоту, фосфатные буферные растворы, эмульгаторы, изотонический солевой раствор и апирогенную воду.

Согласно изобретению предусмотрены все подходящие способы введения. Например, введение лекарственного средства можно осуществлять перорально, подкожно, путем прямой внутривенной инфузии, медленной внутривенной инфузии, непрерывной внутривенной инфузии, внутривенной или эпидуральной контролируемой пациентом анальгезии (КПА), внутримышечного, интратекального, эпидурального, внутрисистемного, внутрибрюшинного, трансдермального, местного, трансмукозального, буккального, сублингвального, трансмукозального, ингаляционного, интраназального, внутрипредсердного, ректального или окулярного введения. Лекарственное средство может быть получено в виде дискретных дозированных единиц и может быть получено любым из способов, хорошо известных в фармацевтике.

Предусмотрены все подходящие фармацевтические лекарственные формы. Введение лекарственного средства может быть осуществлено, например, в форме пероральных растворов и суспензий, таблеток, капсул, пастилок, шипучих таблеток, трансмукозальных пленок, суппозиториев, трансбуккальных продуктов, пероральных мукокорентных
5 продуктов, кремов для местного применения, мазей, гелей, пленок и пластырей, трансдермальных пластырей, препаратов, предотвращающих злоупотребление, и устойчивых к злоупотреблениям препаратов, суспензий стерильных растворов и депо для парентерального применения и т.п., посредством немедленного высвобождения, замедленного высвобождения, отсроченного высвобождения, контролируемого
10 высвобождения, пролонгированного высвобождения и т.п.

Другим аспектом изобретения является применение соединения по изобретению, как определено в данном описании, для получения лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства.

Дополнительным аспектом изобретения является применение соединения по изобретению
15 в качестве индуктора секреции Z A1AT.

Кроме того, предложено соединение по изобретению, как определено в данном описании, для применения для лечения заболевания или расстройства.

Изобретение также включает способ лечения заболевания или расстройства, включающий стадию введения соединения или фармацевтической композиции по изобретению, как
20 определено в данном документе, пациенту, который в этом нуждается.

Изобретение также включает применение соединения по изобретению в качестве индуктора секреции Z A1AT. Применение может состоять в лечении заболевания или расстройства. Дополнительно или альтернативно, применение может быть *in vitro*, например, в анализе *in vitro*.

25 Заболевание или нарушение, подходящее для лечения согласно соответствующим аспектам изобретения, представляет собой заболевание, которое характеризуется низким уровнем A1AT в плазме, например, дефицит α_1 -антитрипсина.

Применение числового диапазона в данном описании однозначно предназначено для включения в объем изобретения всех отдельных целых чисел в пределах диапазона и всех
30 комбинаций чисел верхнего и нижнего пределов в самом широком объеме данного диапазона.

Используемый в настоящем документе термин «содержащий» следует понимать и как содержащий, и как состоящий из. Следовательно, когда изобретение относится к «фармацевтической композиции, содержащей в качестве действующего вещества» соединение, эта терминология предназначена для охвата как композиций, в которых могут присутствовать другие действующие вещества, так и композиций, которые включают только данное действующее вещество.

Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понимает рядовой специалист в области, к которой принадлежит данное изобретение. Точно так же все публикации, заявки на патенты, все патенты и все другие ссылки, упомянутые в настоящем документе, включены в полном объеме посредством ссылок (если это допустимо законом).

Конкретный неисчерпывающих список примеров настоящего изобретения будет приведен со ссылкой на следующие фигуры, на которых:

Фиг. 1 представляет собой график, показывающий дозозависимый эффект N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамида в анализе секреции клеток A1AT *in vitro* с использованием клеток HEK-EBNA, содержащих плазмиды Z A1AT. Носитель и 10 мкМ SAHA тестировали на каждом планшете в качестве контроля. Ось абсцисс показывает различные способы обработки клеток: носитель, SAHA и возрастающие концентрации N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамида, ось ординат – концентрацию A1AT в клеточном супернатанте (в нг/мл);

Фиг. 2 представляет собой график, показывающий действие N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамида при 10 мкМ в анализе секреции клетками A1AT *in vitro* с применением клеток HEK-EBNA, содержащих плазмиду M A1AT. В качестве контроля тестировали носитель и 10 мкМ SAHA. Ось абсцисс показывает различные способы обработки клеток: вспомогательное вещество, SAHA и N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид, ось ординат – концентрацию A1AT в клеточном супернатанте (в нг/мл);

Фиг. 3 представляет собой график, показывающий действие N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамида при концентрации 1 и 10 мкМ в анализе секреции A1AT клетками *in vitro* с применением HEK-EBNA клетки, содержащие плазмиду Siiyama A1AT. В качестве контроля тестировали носитель и 10 мкМ SAHA. На оси абсцисс показаны различные способы обработки клеток: вспомогательное вещество, SAHA и две

концентрации N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамида, на оси ординат – концентрация А1АТ в клеточном супернатанте (в нг/мл);

Фиг. 4 представляет собой график, показывающий влияние N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамида на уровень Z А1АТ у мышей, экспрессирующих Z А1АТ человека (huZ-мыши). Мышам вводили носитель, 5, 15 и 50 мг/кг N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамида два раза в день через желудочный зонд в течение 14 дней подряд. Кровь брали на 12, 7 и 5 дни и готовили плазму для определения циркулирующих базальных уровней Z А1АТ человека. Образцы плазмы, собранные в последние три дня исследования (12, 13 и 14 дни), использовали для определения влияния N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамида на уровень циркулирующего Z-А1АТ человека по сравнению с базовыми уровнями. По оси абсцисс отложена лечебная доза N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамида в мг/кг; ось Y представляет собой средний процентный уровень Z А1АТ человека по сравнению с исходными уровнями для каждой группы, участвовавшей в лечении;

Фиг. 5 представляет собой график, показывающий дозозависимый эффект N, N- (бис-метил-d3)-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамида в анализе секреции клетками А1АТ *in vitro* с применением клеток НЕК-ЕВНА, содержащих плазмиду Z А1АТ. В качестве контроля на каждом планшете тестировали носитель и 10 мкМ SAHA. На оси абсцисс показаны различные способы обработки клеток: носитель, SAHA и возрастающие концентрации N, N-(бис-метил-d3)-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамида, на оси ординат – концентрация А1АТ в супернатанте клеток (в нг/мл);

Фиг. 6 представляет собой график, показывающий дозозависимый эффект N-метил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамида в анализе секреции клетками А1АТ *in vitro* с применением клеток НЕК-ЕВНА, содержащих плазмиду Z А1АТ. В качестве контроля на каждом планшете тестировали носитель и 10 мкМ SAHA. На оси абсцисс показаны различные способы обработки клеток: вспомогательное вещество, SAHA и возрастающие концентрации N-метил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил) бензамида, на оси ординат – концентрация А1АТ в супернатанте клеток (в нг/мл);

На фиг. 7А и В показаны вестерн-блоты Z А1АТ после выделения и обработки трипсином. Z А1АТ был выделен после воздействия на одну мышь дикого типа (15.5b) и трех мышей HuZ (22.1e, 24.1a, 24.1b) N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамидом в дозе 200 мг/кг через желудочный зонд 2 раза в день в течение 10 дней. Каждый вестерн-

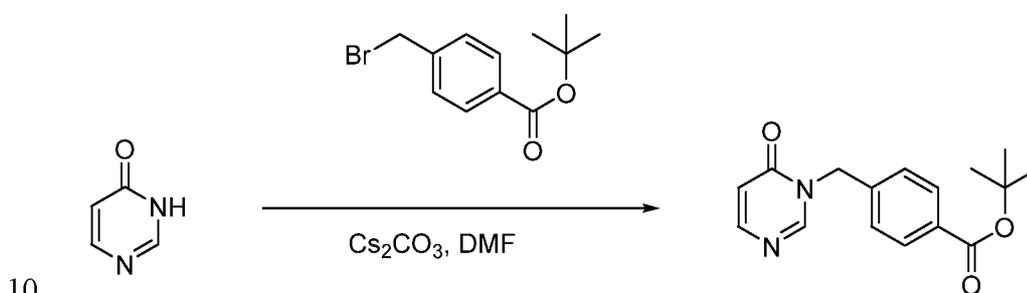
блот помечается идентификатором мыши. Полосы геля обозначены в соответствии с таблицей 4. Полосы белка обозначены как «С» - комплекс, «NA» – нативный антитрипсин и «СА» – расщепленный антитрипсин.

Экспериментальная часть

5 Пример 1: N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамид

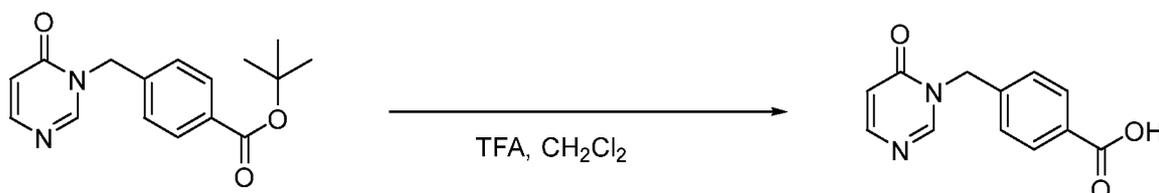
N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамид получали с использованием следующих последовательных процедур синтеза.

(а) Синтез трет-бутил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензоата



Пиримидин-4(3Н)-он (5 г, 32 ммоль) и цезия карбонат (50,85 г, 156 ммоль) перемешивали в диметилформамиде (50 мл) в течение 10 минут при комнатной температуре. Добавляли трет-бутил-4-(бромметил)бензоат (14,11 г, 52 ммоль) и перемешивали реакционную смесь в течение 3 часов. Реакционную смесь разбавляли водой и полученный желтый осадок собирали фильтрованием. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на диоксиде кремния, элюируя смесью этилацетат/гексан (от 30% до 33%), с получением трет-бутил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензоата. Tlc Rf 0,2 этилацетат/гексан, 1:1.

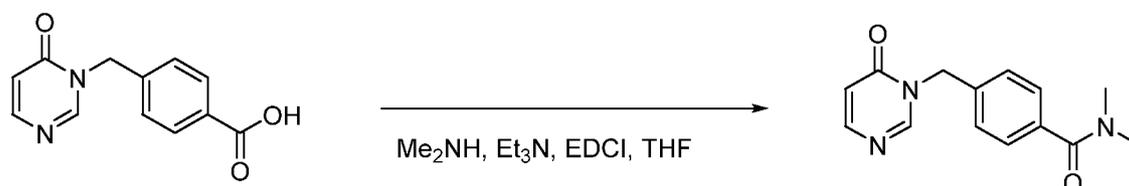
(б) Синтез 4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензойной кислоты



Трет-бутил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензоат (10 г, 35 ммоль) растворяли в дихлорметане (50 мл) и медленно добавляли трифторуксусную кислоту (70 мл). Реакционную смесь перемешивали 3 часа при комнатной температуре. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и полученную маслянистую жидкость

перемешивали с диэтиловым эфиром (300 мл) в течение 20 минут при комнатной температуре. Полученное твердое вещество собирали фильтрованием, промывали диэтиловым эфиром (2 x 30 мл) и сушили в вакууме с получением 4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензойной кислоты.

5 (с) Синтез N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамида



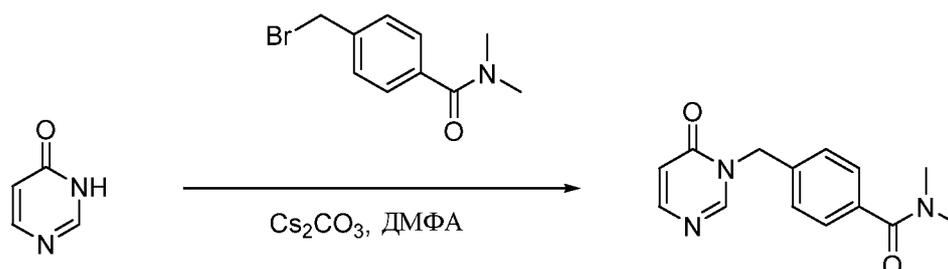
4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензойную кислоту (16 г, 69 ммоль) и N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорид (18 г, 139 ммоль) перемешивали в тетрагидрофуране (100 мл) в течение 10 минут при 0 °С в атмосфере азота. Затем реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры. Добавляли триэтиламин (21,11 г, 208 ммоль) и диметиламин (2М раствор в тетрагидрофуране, 69 ммоль), реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и остаток пропускали через капиллярную кварцевую колонку, элюируя 4% метанолом в дихлорметане. Фракции, содержащие продукт, концентрировали с получением N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамида.

ТСХ Rf 0,8 10% метанол в дихлорметане.

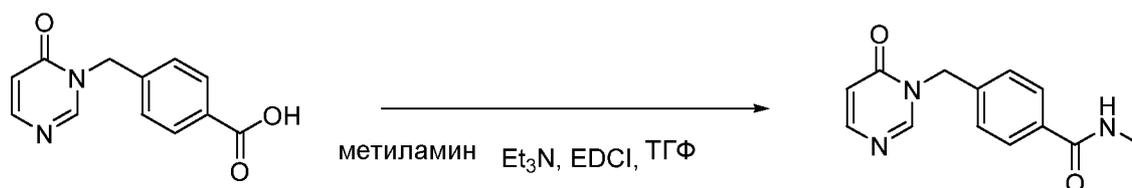
m/z: 257.96 (calc 258.12)

^1H NMR (400 MHz, d_6 DMSO) δ 8.69 (1H, s), 7.94 (1H, d), 7.38 (4H, m), 6.44 (1H, d), 5.13 (2H, s), 2.96 (3H, br s), 2.87 (3H, br s).

20 N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид также может быть получен путем алкилирования пиримидин-4(3H)-она 4-(бромметил)-N,N-диметилбензамидом аналогично стадии а).



Пример 2: N-метил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид

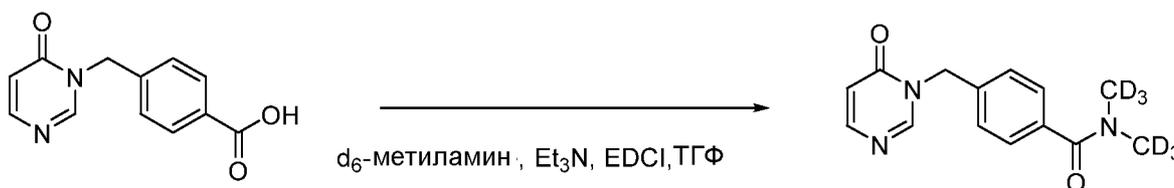


N-метил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид получали аналогично N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамиду с применением метиламина вместо диметиламина на стадии с.

5 m/z: 242.90 (calc 243.10)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, d_6 DMSO) δ 8.69 (1H, s), 8.42 (1H, br m), 7.94 (1H, d), 7.79 (2H, d), 7.37 (2H, d), 6.43 (1H, d), 5.13 (2H, s), 2.77 (3H, s).

Пример 3: N, N-(бис-метил-d3)-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид



10 N,N-(бис-метил-d3)-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид получали аналогично N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамиду с применением d_6 -диметиламина вместо диметиламина на стадии с.

ТСХ Rf 0,8 10% метанол в дихлорметане.

15 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, d_6 DMSO) δ 8.69 (1H, s), 7.94 (1H, d), 7.38 (4H, m), 6.44 (1H, d), 5.13 (2H, s).

Пример 4: Активность соединений, представленных в изобретении, в анализе секреции клетками A1AT с применением клеток НЕК-Z

Методы

Клетки НЕК-Z, линию клеток эмбриональной почки человека, стабильно трансфицированную геном Z A1AT человека, высевали в 96-луночные планшеты (3,0 x 105 клеток/мл с 200 мкл среды/лунку) в течение ночи при 37 °C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. После инкубации клетки трижды промывали 200 мкл бессывороточной среды и среду заменяли вариантами в четырех повторностях с применением бессывороточной среды, содержащей любой из носителей, 10 мкМ

суберанилогидроксамовой кислоты (SAHA), N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид (в концентрациях 10, 33, 100 и 333 нМ), N, N- (бис-метил-d3)-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид (в концентрациях 10, 33, 100 и 333 нМ) или N-метил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид (в концентрациях 10, 33, 100 и 333 нМ) в течение 48 ч в инкубаторе при 37 °С в конечном объеме 200 мкл. В конце стадии инкубации супернатанты удаляли из лунок, центрифугировали при 1000 мкг при 4 °С в течение 10 минут и анализировали уровни А1АТ человека с помощью ИФА (набор серпин А1/α₁-антитрипсин человека ELISA, R&D Systems, DY1268) согласно инструкциям производителя.

10 Вкратце, 96-луночный планшет покрывали иммобилизованным антителом А1АТ человека в течение ночи при комнатной температуре (разведение 1: 180 от исходного раствора, конечный объем 100 мкл/лунку). Затем иммобилизованные антитела удаляли, лунки трижды промывали 300 мкл промывочного буфера (0,05% твин-20 в PBS), а затем 200 мкл раствора реагента (25% твин-20 в PBS) инкубировали в каждой лунке в течение 1
15 часа при комнатной температуре. Затем в каждую лунку в двух повторах добавляли разбавленные образцы, стандарты (125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 и 8000 пг/мл А1АТ), планшеты покрывали герметиком и оставляли при комнатной температуре на 2 часа. В конце этапа инкубации образцы удаляли, все лунки промывали, как описано выше, в каждую лунку добавляли 100 мкл детектирующего антитела (разведение 1:180 от исходного
20 раствора) и инкубировали еще 2 часа при комнатной температуре. После инкубации с детектирующим антителом супернатант удаляли, лунки промывали, как описано выше, добавляли 100 мкл раствора стрептавидина – HRP (разведение 1: 200 от исходного раствора) в каждую лунку и оставляли на 20 минут в темноте. После этого добавляли 50
25 мкл стоп-раствора (2М H₂SO₄) и считывали оптическую плотность (OD) каждой лунки при 450 нм, вычитая значение холостой пробы 570 нм из значения каждой лунки с применением считывающего устройства для микропланшетов. Была построена 4-параметрическая логистическая кривая с применением GraphPad Prism 7, концентрации А1АТ были определены в каждом образце путем интерполяции стандартной кривой и умножения на соответствующий коэффициент разбавления.

30 Полученные результаты

Количество А1АТ, которое секретируют трансфицированные клетки НЕК-ЕВНА в среду, измеряли с помощью ИФА. SAHA в концентрации 10 мкМ использовали в качестве положительного контроля для всех экспериментов по секреции А1АТ in vitro.

Данные на Фиг. 1 показывают, что N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамид дозозависимо стимулирует секрецию Z A1AT, как измерено с помощью ИФА.

5 Данные на Фиг. 5 показывают, что N, N-(бис-метил-d3)-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамид дозозависимо стимулирует секрецию Z A1AT, как измерено с помощью ИФА.

Данные на Фиг. 6 показывают, что N-метил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамид дозозависимо стимулирует секрецию Z A1AT, как измерено с помощью ИФА.

10 **Пример 5: Активность соединений, представленных в изобретении в анализе секреции клеток A1AT с использованием клеток НЕК-М**

Методы

Клетки НЕК-М, линию клеток эмбриональной почки человека, стабильно трансфицированную геном M A1AT человека, высевали в 96-луночные планшеты (3,0 x 10⁵ клеток/мл с 200 мкл среды/лунку) в течение ночи при 37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. После инкубации клетки трижды промывали 200 мкл бессывороточной среды, и среду заменяли бессывороточной средой, содержащей носитель, 10 мкМ суберанилогидроксамовой кислоты (SAHA), или соединение, представленное в настоящем изобретении (при 10 мкМ) в шести повторностях и выдерживали 48 ч в инкубаторе при 37 °С до конечного объема 200 мкл. В конце стадии инкубации супернатанты удаляли из лунок, центрифугировали при 1000 мкг при 4 °С в течение 10 минут и анализировали уровни A1AT человека с помощью ИФА (набор серпин A1/α1-антитрипсин человека ELISA, R&D Systems, DY1268) согласно инструкциям производителя.

25 Вкратце, 96-луночный планшет покрывали иммобилизованным антителом A1AT человека в течение ночи при комнатной температуре (разведение 1:180 от исходного раствора, конечный объем 100 мкл/лунку). Затем иммобилизованные антитела удаляли, и лунки трижды промывали 300 мкл промывочного буфера (0,05% твин-20 в PBS), а затем 200 мкл раствора реагента (25% твин-20 в PBS) инкубировали в каждой лунке в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем в каждую лунку в двух повторах добавляли разбавленные образцы, стандарты (125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 и 8000 пг/мл A1AT), планшеты покрывали герметиком и оставляли при комнатной температуре на 2 часа. В

конец этапа инкубации образцы удаляли, все лунки промывали как описано выше, в каждую лунку добавляли 100 мкл детектирующего антитела (разведение 1:180 от исходного раствора) и инкубировали еще 2 часа при комнатной температуре. После инкубации с детектирующим антителом супернатант удаляли, лунки промывали как описано выше, добавляли 100 мкл раствора стрептавидина – HRP (разведение 1:200 от исходного раствора) в каждую лунку и оставляли на 20 минут в темноте. После этого добавляли 50 мкл стоп-раствора (2M H₂SO₄) и определяли оптическую плотность (OD) каждой лунки при 450 нм, вычитая значение холостой пробы 570 нм из значения каждой лунки с применением считывающего устройства для микропланшетов. С применением GraphPad Prism 7 была построена 4-параметрическая логистическая кривая и в каждом образце были определены концентрации A1AT путем интерполяции стандартной кривой и умножения на соответствующий коэффициент разбавления.

Полученные результаты

Количество A1AT, которое секретируется трансфицированными клетками HEK-EBNA в среду, измеряли с помощью ИФА. SAHA в концентрации 10 мкМ использовали в качестве положительного контроля для всех экспериментов по секреции A1AT in vitro.

Данные на Фиг. 2 показывают, что N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид не стимулирует секрецию M A1AT при 10 мкМ, как измерено с помощью ИФА. Напротив, положительный контроль 10 мкМ SAHA стимулирует увеличение секреции M A1AT.

Пример 6: Активность соединений, представленных в изобретении в анализе секреции клетками A1AT с использованием клеток HEK-Siiyama

Редкая мутация Siiyama (Ser 53 на Phe, нумерация зрелых A1AT) была идентифицирована у японского мужчины с AATD (Seyama et al. J Biol Chem (1991) 266: 12627-32). Ser53 является одним из консервативных остатков серпина, считается, что он важен для организации внутреннего ядра молекулы A1AT. Замена незаряженной полярной аминокислоты на большую неполярную аминокислоту в консервативном остове белка влияет на укладку и внутриклеточный процессинг Siiyama A1AT.

Методы

Клетки HEK-Siiyama, линию эмбриональных клеток почек человека, стабильно трансфицированных геном Siiyama A1AT человека, высевали в 96-луночные планшеты (3,0 x 10⁵ клеток/мл с 200 мкл среды/лунку) в течение ночи при 37 °C в увлажненной атмосфере,

содержащей 5% CO₂. После инкубации клетки трижды промывали 200 мкл бессывороточной среды и среду заменяли бессывороточной средой, содержащей либо носитель, 10 мкМ суберанилогидроксамовую кислоту (SANA), либо соединение по изобретению (в концентрации 1 или 10 мкМ), в восьми повторах в течение 48 ч в инкубаторе при 37 °С в конечном объеме 200 мкл. В конце стадии инкубации супернатанты удаляли из лунок, центрифугировали при 1000 мкг при 4 °С в течение 10 минут и анализировали уровни А1АТ человека с помощью ИФА (набор серпин А1/ α₁-антитрипсин человека ELISA, R&D Systems, DY1268) согласно инструкциям производителя.

Вкратце, 96-луночный планшет покрывали иммобилизованным антителом А1АТ человека в течение ночи при комнатной температуре (разведение 1: 180 от исходного раствора, конечный объем 100 мкл/лунку). Затем иммобилизованные антитела удаляли, лунки трижды промывали 300 мкл промывочного буфера (0,05% твин-20 в PBS), а затем 200 мкл раствора реагента (25% твин-20 в PBS) инкубировали в каждой лунке в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем в каждую лунку в двух экземплярах добавляли разбавленные образцы, стандарты (125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 и 8000 пг/мл А1АТ), планшеты покрывали герметиком и оставляли при комнатной температуре на 2 часа. В конце этапа инкубации образцы удаляли, все лунки промывали как описано выше, в каждую лунку добавляли 100 мкл детектирующего антитела (разведение 1: 180 от исходного раствора) и инкубировали еще 2 часа при комнатной температуре. После инкубации с детектирующим антителом супернатант удаляли, лунки промывали, как описано выше, добавляли 100 мкл раствора стрептавидина – HRP (разведение 1: 200 от исходного раствора) в каждую лунку и оставляли на 20 минут в темноте. После этого добавляли 50 мкл стоп-раствора (2M H₂SO₄) и считывали оптическую плотность (OD) каждой лунки при 450 нм, вычитая значение холостой пробы 570 нм из значения каждой лунки с применением считывающего устройства для микропланшетов. С применением GraphPad Prism 7 была построена 4-параметрическая логистическая кривая, и в каждом образце были определены концентрации А1АТ путем интерполяции стандартной кривой и умножения на соответствующий коэффициент разбавления.

Полученные результаты

Количество А1АТ человека, который секретировали трансфицированные клетки НЕК-EBNA в среду, измеряли с помощью ИФА. SANA в концентрации 10 мкМ использовали в качестве положительного контроля для всех экспериментов по секреции А1АТ in vitro.

Данные на Фиг. 3 показывают, что N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид не стимулирует секрецию Siiyama A1AT при 1 или 10 мкМ, как измерено с помощью ИФА. Напротив, положительный контроль 10 мкМ SANA стимулирует увеличение секреции Siiyama A1AT.

5 **Пример 7: Активность N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамида у мышей huZ**

Мышь huZ (также называемая мышью PiZZ) представляет собой линию трансгенных мышей, которая содержит несколько копий Z-варианта гена A1AT человека, разработанного двумя отдельными группами, Dusaico et al (Science (1988) 242: 1409-12) и
10 Carlson *et al* (J. Clin Invest (1989) 83: 1183-90). Мыши PiZZ относятся к линии C57Bl/6 и экспрессируют белок Z A1AT человека в ткани печени. Мыши, примененные в этом исследовании, происходят от потомства Карлсона и его коллег (трансгенная линия Z11.03). Мышей HuZ использовали в качестве инструмента для оценки воздействия соединений либо на повышение уровня Z A1AT в плазме крови, либо на накопление полимеров Z A1AT
15 в печени и связанные с этим патологии этого органа.

Методы

Мышам HuZ (n = 4/группа; самцы или самки) с базовыми уровнями A1AT человека в плазме от 200 до 600 мкг/мл вводили либо носитель, либо N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид в дозе 5, 15 или 50 мг/кг два раза в день через желудочный зонд
20 в течение 14 дней подряд. Мыши имели доступ к пище (стандартный корм для мышей, БЕЗОПАСНЫЕ диеты) и воде ad libitum. На 14 день исследования каждой мышши вводили дозу за час до терминальных процедур. Кровь брали у каждой мышши из хвостовой вены на 12, 7 и 5 дни до введения дозы и в 12, 13 и 14 дни введения дозы. Кровь собирали в микроветы, содержащие ЭДТА, и плазму готовили центрифугированием при 2700 x g при
25 4°C в течение 10 мин. Плазму отбирали на аликвоты и хранили при -80 ° C для биоанализа. Образцы плазмы, взятые на 12, 7 и 5 день до введения дозы использовали для определения средних базальных уровней Z A1AT человека для каждой мышши. Образцы плазмы, собранные в последние три дня исследования (дни 12, 13 и 14), использовали для определения эффекта N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамида на
30 секрецию Z A1AT путем измерения уровней Z A1AT человека и сравнения с базовыми уровнями для каждой мышши. Уровни Z-A1AT человека в образцах плазмы мышшей измеряли с помощью ИФА (ELISA, двойной набор серпин-антитрипсина человека, R&D Systems, DY1268) в соответствии с инструкциями производителя.

Вкратце, 96-луночный планшет покрывали иммобилизованным антителом A1AT человека и оставляли течение ночи при комнатной температуре (разведение 1: 180 от исходного раствора, конечный объем 100 мкл/лунку). Затем иммобилизованные антитела удаляли, и лунки трижды промывали 300 мкл промывочного буфера (0,05% твин-20 в PBS), а затем 200 мкл раствора реагента (25% твин-20 в PBS) инкубировали в каждой лунке в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем в каждую лунку в двух повторах добавляли разбавленные образцы, стандарты (125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 и 8000 пг/мл A1AT), планшеты покрывали герметиком и оставляли при комнатной температуре на 2 часа. В конце этапа инкубации образцы удаляли и все лунки промывали как описано выше, в каждую лунку добавляли 100 мкл детектирующего антитела (разведение 1: 180 от исходного раствора) и инкубировали еще 2 часа при комнатной температуре. После инкубации с детектирующим антителом супернатант удаляли, лунки промывали, как описано выше, добавляли 100 мкл раствора стрептавидина – HRP (разведение 1: 200 от исходного раствора) в каждую лунку и оставляли на 20 минут в темноте. После этого добавляли 50 мкл стоп-раствора (2M H₂SO₄) и считывали оптическую плотность (OD) каждой лунки при 450 нм, вычитая значение холостой пробы 570 нм из значения каждой лунки с применением считывающего устройства для микропланшетов. С применением GraphPad Prism 7 была построена 4-параметрическая логистическая кривая, и в каждом образце были определены концентрации A1AT путем интерполяции стандартной кривой и умножения на соответствующий коэффициент разбавления.

Полученные результаты

Эффект N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамида на циркулирующий уровень Z A1AT человека оценивали на модели мыши huZ. Мышам вводили соединение в течение 14 дней подряд при помощи перорального зонда два раза в день в дозе 5, 15 или 50 мг/кг.

Данные на Фиг. 4 показывают, что N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид дозозависимо стимулирует секрецию Z A1AT человека по сравнению с исходными уровнями у мышей huZ.

Пример 8: Фармакокинетика N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамида у мышей.

N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид вводили самцам мышей C57Bl/6 внутривенно (2 мг/кг) или перорально (10 мг/кг) через желудочный зонд. От животных, которым вводили дозу, получали цельную кровь, разбавленную водой, в течение

периода времени до 24 часов после введения, чтобы можно было измерить концентрацию лекарственного средства в крови с помощью ВЭЖХ-МС/ МС. Измеренный уровень препарата позволил рассчитать следующие параметры для N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамида:

5 Период полувыведения из крови ($t_{1/2}$) = 1,9 ч.

Наблюдаемый клиренс = 7,8 мл/мин/кг.

Объем распределения (V_z) = 1,3 л/кг

C_{max} при пероральном введении = 9311 нг/мл

AUC_{all} = 15551 нг.ч/мл

10 AUC_{INF} = 15564 нг.ч/мл

Биодоступность при пероральном введении (F , AUC_{INF}) = 73%

Пример 9: Фармакокинетика соединений, представленных в изобретении, у крыс.

15 Соединения вводили крысам Sprague Dawley внутривенно (2 мг/кг) или перорально (10 мг/кг) через желудочный зонд. От животных, которым вводили дозу, получали цельную кровь, разбавленную водой, в течение периода времени до 24 часов после введения, чтобы можно было измерить концентрацию лекарственного средства в крови с помощью ВЭЖХ-МС/ МС.

20 Измеренные уровни соединения после введения N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамида позволили рассчитать следующие параметры для N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамида:

Период полувыведения из крови ($t_{1/2}$) = 55 мин.

Наблюдаемый клиренс = 10,6 мл/мин/кг.

Объем распределения (V_z) = 0,84 л/кг

C_{max} при пероральном приеме = 5326 нг/мл

25 Пероральный AUC_{INF} = 16465 нг.ч/мл.

Биодоступность при пероральном введении (F) = 104%.

Уровень в плазме N-метил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамида в плазме в различные моменты времени после перорального введения дозы 10 мг/кг N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамида показан в таблице 1.

5 **Таблица 1. Уровни N-метил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамида в плазме после перорального введения дозы N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамида**

<u>Время (мин)</u>	<u>Средний уровень в плазме N-метил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид (нг/мл)</u>
5	369
15	548
30	1047
60	1395
120	1465
240	528
480	224
1440	62

10 Уровень N-метил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамида в плазме в различные моменты времени после внутривенного введения дозы 2 мг/кг N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид, как показано в таблице 2.

Таблица 2. Уровни N-метил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамида в плазме после внутривенного введения дозы N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамида

<u>Время (мин)</u>	<u>Средний уровень в плазме N-метил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид (нг/мл)</u>
2	51

6	78
10	115
15	102
30	257
60	321
240	90
480	13

Измеренные уровни соединения после введения N-метил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамида позволили рассчитать следующие параметры для N-метил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамида:

5 Период полувыведения из крови ($t_{1/2}$) = 63 мин.

Наблюдаемый клиренс = 10,6 мл/мин/кг.

Объем распределения (V_z) = 1,0 л/кг.

10 Измеренные уровни соединения после введения N, N-бис(метил-d3)-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамида позволили рассчитать следующие параметры для N, N-бис(метил-d3)-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамид:

Период полувыведения из крови ($t_{1/2}$) = 52 мин.

Наблюдаемый клиренс = 10,6 мл/мин/кг.

Объем распределения (V_z) = 0,72 л/кг.

15 **Пример 10. Стабильность соединений, представленных в настоящем изобретении, в гепатоцитах мыши, крысы и человека**

20 Собственный клиренс (CL_{int}) и период полувыведения соединений, представленных в изобретении, измеряли в суспензии гепатоцитов криоконсервированных гепатоцитов самцов мышей C57BL6, суспензии гепатоцитов криоконсервированных гепатоцитов крысы или смешанной суспензии гепатоцитов криоконсервированных гепатоцитов человека. Вкратце, соединение инкубировали с суспензиями гепатоцитов при 37 °C в

течение определенного времени, а оставшееся соединение в каждый контрольный момент времени оценивали с помощью масс-спектрометрии (ВЭЖХ/МС). CL_{int} в гепатоцитах мыши, крысы и человека составлял <3 мкл/мин/10⁶ клеток для всех соединений. Период полувыведения в гепатоцитах мыши, крысы и человека для всех соединений составлял > 460 мин.

Пример 11: Связывание с белками плазмы соединений, представленных в изобретении

Степень связывания соединений, представленных в настоящему изобретении, с белками плазмы, такими как альбумин и альфа-1-кислотный гликопротеин в плазме человека, крысы или мыши, определяли с помощью быстрого равновесного диализа. Соединения инкубировали в количестве 5 мкМ в течение 4 часов при 37 °С. Связывание с белками плазмы для N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамида в плазме мышей составляло 37,3%, в плазме крыс – 14,8%, в плазме человека – 30,6%.

Пример 12: Активность соединений изобретения в отношении цитохрома P450s

Используя мембраны E.coli CYP_{EX} в сочетании со специфическими субстратами зондов, оценивали ингибирование индивидуальных CYP соединениями, представленными в изобретении с использованием метода, описанного в Weaver et al., 2003, Drug Metab Dispos 31: 7, 955-966. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Данные ингибирования CYP in vitro для N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамида

Ингибирование CYP IC ₅₀ – μM				
1A2	2C9	2C19	2D6	3A4
>50	>50	>50	>50	>50

Пример 13: Активность соединений, представленных в изобретении, в отношении HERG-канала

Соединения, представленные в изобретении, тестировали на ингибирование калиевых каналов в сердце (hERG) с использованием автоматического патч-зажима Patchliner. 6-

точечные кривые "концентрация-эффект" были построены с применением полулогарифмических серийных разведений максимальной конечной тестовой концентрации 100 мкМ. Значения IC50 были получены из 4-параметрической логистической модели данных «концентрация-эффект». Было показано, что N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамид имеет IC50 > 100 мкМ с 7% ингибированием при 100 мкМ. Значения эталонных соединений соответствовали представленным в литературе (Elkins et al., 2013 J.Pharm.Tox.Meth. 68: 11-122).

Пример 14: Активность соединений по изобретению против группы ферментов, ионных каналов и рецепторов

Соединения, представленные в изобретении, тестировали с помощью панели DiscoverX Safety47TM. N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6Н)-ил)метил)бензамид показал исключительно чистый целевой профиль при 10 мкМ. При этой концентрации ни одна мишень не подавлялась более чем на 25%.

Пример 15: Растворимость соединений, представленных в изобретении, в воде

Соединения, представленные в изобретении, встряхивали в течение 5 минут с увеличивающимся количеством воды до образования прозрачного раствора. При использовании этого метода растворимость N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1 (6Н)-ил)метил)бензамида составляла более 100 мг/мл.

Пример 16: Активность соединений, представленных в настоящем изобретении, в тесте на обратные мутации у бактерий

Целью теста на обратные мутации бактерий является оценка мутагенного потенциала тестируемого объекта по его способности возвращать указанные бактериальные штаммы от ауксотрофного роста к прототрофии. Анализ выявляет точечные (генные) мутации в определенных локусах гистидина или триптофана, которые могут быть индуцированы соединениями, вызывающими замены пар оснований или мутации сдвига рамки считывания в геноме этих организмов. Анализы проводили в присутствии и в отсутствие экзогенной системы окислительного метаболизма млекопитающих (смесь S-9, постмитохондриальная фракция печени, полученная из печени крыс, обработанных Aroclor 1254), для имитации метаболизма млекопитающих. Методология испытаний основана на установленных процедурах тестирования бактериальной мутагенности.

N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид был протестирован на уровне нормативной максимальной дозы 5000 мкг/чашку для всех штаммов в присутствии и в отсутствие смеси S-p9.

Не было никаких доказательств токсичности, осадок отсутствовал.

5 Не наблюдалось увеличения количества ревертантов больше, чем определенное кратное увеличение (в два раза выше соответствующего значения отрицательного контроля для TA98, TA100 или WP2 *uvrA* или в три раза выше соответствующего значения отрицательного контроля для TA1535 или TA1537) ни в одном штамме при любой дозе N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамида в присутствии или в
10 отсутствие смеси S-9 в условиях теста Эймса.

N,N-диметил-4 - ((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид не проявлял мутагенности в условиях этого теста.

Пример 17: Активность соединений, представленных в изобретении, в тесте выявления микроядер *in vitro*

15 Целью теста выявления микроядер *in vitro* является оценка способности исследуемого объекта вызывать повреждение хромосомы или веретена или вмешиваться в клеточный цикл способами, которые приводят к образованию микроядер в цитоплазме клеток ТК6. Считается, что хромосомные дефекты лежат в основе ряда генетических заболеваний человека. Микроядра появляются в результате того, что фрагменты хромосом или целые
20 хромосомы остаются в цитоплазме и не включаются в ядра вновь образованных клеток. Они возникают из-за повреждения хромосом, приводящего к появлению ацентрических фрагментов, которые не могут прикрепиться к митотическому веретену, повреждений веретенообразного аппарата, препятствующих прикреплению к нему хромосомы, или вмешиваются в деление клетки другим образом. Тест проводили в присутствии и в
25 отсутствие экзогенной системы окислительного метаболизма млекопитающих (смесь S-9, постмитохондриальная фракция печени, полученная из печени крыс, обработанных Aroclor 1254) для имитации метаболизма млекопитающих. Клетки подвергали действию испытуемого объекта в течение 3 часов и брали пробы через 44 часа после начала обработки. Поскольку сообщалось, что ряд химических веществ оказывает
30 положительное действие только после продолжительного лечения, также была включена непрерывная обработка в течение 27 часов в отсутствие смеси S-9. Это в 1,5–2 раза больше среднего времени генерации культивируемых клеток, использованных при

проведении теста. Методология тестирования была основана на установленных процедурах выявления микроядер *in vitro*.

N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид был протестирован на уровне нормативной максимальной дозы 1 мМ (260 мг/мл) во всех вариантах лечения. Только при 27-часовой обработке не было выпадения осадка и наблюдалась лишь небольшая цитотоксичность. Относительное увеличение количества клеток (RICC) при 260 мг/мл составило 105% в присутствии смеси S-9 при 3-часовой обработке, 98% в отсутствие смеси S-9 при 3-часовой обработке и 74% в отсутствие смеси S-9 с 27-часовой обработкой по сравнению с одновременным отрицательным контролем.

Не было статистически значимого увеличения процентного содержания микроядер (%) ни в присутствии смеси S-9 при 3-часовой обработке, ни в отсутствие смеси S-9 при 3-часовой или 27-часовой обработке. При отсутствии смеси S-9 при 3-часовой обработке наблюдалась заметная тенденция, но, поскольку не было статистически значимого увеличения, и все процентные значения содержания микроядер находились в пределах 95%-ных контрольных пределов HCD, это было сочтено несущественным.

N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил) бензамид не обладал ни кластогенностью, ни аневгенностью в присутствии или отсутствии смеси S-9 в условиях этого теста.

Пример 18: Ингибирование трипсина Z A1AT человека, секретлируемого в присутствии соединений, представленных в изобретении, у мышей huZ

Целью эксперимента была очистка Z A1AT человека трех мышей HuZ, которым вводили соединение N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид (22.1e, 24.1a, 24.1b), а затем проверка активности A1AT реакцией с увеличивающимся количеством трипсина. Реакцию A1AT с трипсином анализировали с помощью вестерн-блоттинга с применением выявляющих антител к A1AT человека. Также в исследование была включена контрольная плазма мышей дикого типа, обработанная тем же соединением (15.5b).

Методы

Мышам вводили N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-201(6H)-ил)метил)бензамид в дозе 200 мг/кг дважды в день через желудочный зонд в течение 10 дней подряд. Мыши имели доступ к пище (стандартный корм для мышей, БЕЗОПАСНЫЕ диеты) и воде *ad libitum*. На 10 день исследования каждой мыши вводили дозу за 3,5-4,5 часа до терминальных

процедур. Кровь брали у каждой мыши при помощи сердечной пункции и собирали в пробирки, содержащие EDTA 25, а плазму готовили центрифугированием при 2700 x g при 4 °C в течение 10 мин. Плазма была разделена на аликвоты и перед анализом хранилась при -80 °C.

5 100 мкл мышинной плазмы перед очисткой разбавляли до 300 мкл 20 mM Трис, 150 mM NaCl, 5 mM ЭДТА, pH 7,4 (реакционный и промывочный буфер). Затем к плазме добавляли промытые гранулы α_1 -антитрипсина (150 мкл) (GE Life Sciences) и перемешивали на качалке в течение 30 минут. Затем гранулы отделяли от плазмы центрифугированием на спин-колонке (Thermo Scientific). После промывки гранул
10 реакционным буфером 5 x 100 мкл, A1AT элюировали с них 3 x 100 мкл 20 mM Трис, 150 mM NaCl, 0,6 M MgCl₂, 5 mM ЭДТА, pH 7,4. A1AT элюировали непосредственно в 300 мкл реакционного буфера, чтобы гарантировать, что не произошло его агрегации. Остаточный A1AT в плазме и супернатанте плазмы количественно определяли с использованием ИФА человеческого serpinA1 (ELISA, двойной набор Serpin A1 / α_1 -антитрипсин человека, R&D Systems, DY1268) для подтверждения истощения
15 человеческого A1AT. Также измеряли концентрацию элюированных фракций. Количество элюированного A1AT определяли путем измерения с помощью A280 с использованием коэффициента экстинкции 0,45.

Активность элюированного A1AT проверяли, оценивая его способность образовывать
20 комплекс с трипсином. Реакционные смеси готовили, как показано в таблице 4. Реакционные смеси инкубировали в течение 5 минут перед добавлением 1 мкл 1 mM 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонилфторида гидрохлорида. Еще через 10 минут добавляли 21 мкл буфера SDS и кипятили в течение 5 минут. Образцы обрабатывали в 10% геле SDS и наносили на нитроцеллюлозную мембрану. Затем мембрану блокировали PBS
25 0,1% тритона x-100, 5% сухого обезжиренного молока, затем зондировали кроличьими антителами к α_1 антитрипсину человека (AbD serotec 0640-5039) в течение ночи при 4 °C. После промывания мембраны PBS, 0,1% тритоном X-100, 0,1% обезжиренным молоком блоты зондировали конъюгатом к кроличьему IgG HRP. После дополнительных промывок мембраны блоты проявляли с использованием хемилюминесцентного
30 субстрата SuperSignal West pico PLUS (Thermo Scientific). Результат показан на рисунках 7A и B.

Таблица 4. Условия экспериментов для различных обработок изолированного Z A1AT

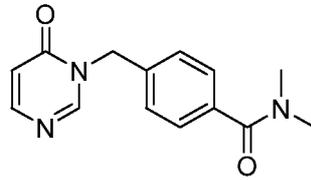
Полоса геля	Прибл. Молярное соотношение (A1AT: трипсин)	A1AT (100мкг/мл, 185 мкМ)	Трипсин (86 мкг/мл, 370 мкМ)	Буфер
1	1:0	10 мкл	0 мкл	10 мкл
2	4:1	10 мкл	1.25 мкл	8.75 мкл
3	2:1	10 мкл	2.5 мкл	7.5 мкл
4	1:1	10 мкл	5 мкл	5 мкл
5	1:1.25	10 мкл	6.25 мкл	3.75 мкл
6	1:1.5	10 мкл	7.5 мкл	2.5 мкл
7	1:0	10 мкл	10 мкл	0 мкл
8	Контрольный образец трипсина	0 мкл	5 мкл	15 мкл

Полученные результаты

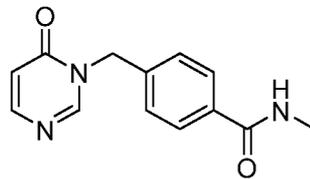
Данные на Фиг. 7А и В показывают, что человеческий A1AT не может быть обнаружен в плазме контрольной мыши дикого типа (15.5b - см. Фиг. 7В). Z A1AT человека был обнаружен в трех других образцах мышей huZ (см. Фиг. 7А и В). При реакции с увеличивающимся количеством трипсина все образцы продемонстрировали полную реакцию с трипсином, на что указывает потеря нативной полосы (обозначенной «NA») и образование сложных («С») или расщепленных полос («СА»), что указывает на то, что Z A1AT в элюированной фракции является нативным и полностью активным.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

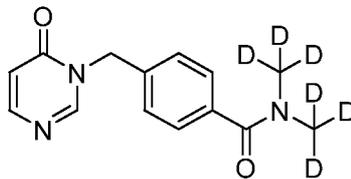
1. Производное оксопиримидинилметилбензамида, которое представляет собой N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид:



5 2. Производное оксопиримидинилметилбензамида, которое представляет собой N-метил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид:



3. Производное оксопиримидинилметилбензамида, которое представляет собой N, N-бис(метил-d₃)-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид:



10

4. Соединение по любому из пп.1-3 в форме фармацевтически приемлемой соли или кристаллической форме.

5. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1-4 и фармацевтически или терапевтически приемлемое вспомогательное вещество или носитель.

15

6. Применение соединения по любому из пп.1-4 для получения лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства.

7. Соединение по любому из пп.1-4 для применения для лечения заболевания или расстройства.

20

8. Соединение по любому из пп.1-4 для применения в качестве индуктора секреции Z A1AT.

9. Способ лечения заболевания или расстройства, включающий стадию введения соединения по любому из пп.1-4 или фармацевтической композиции по п.5 пациенту, нуждающемуся в этом.

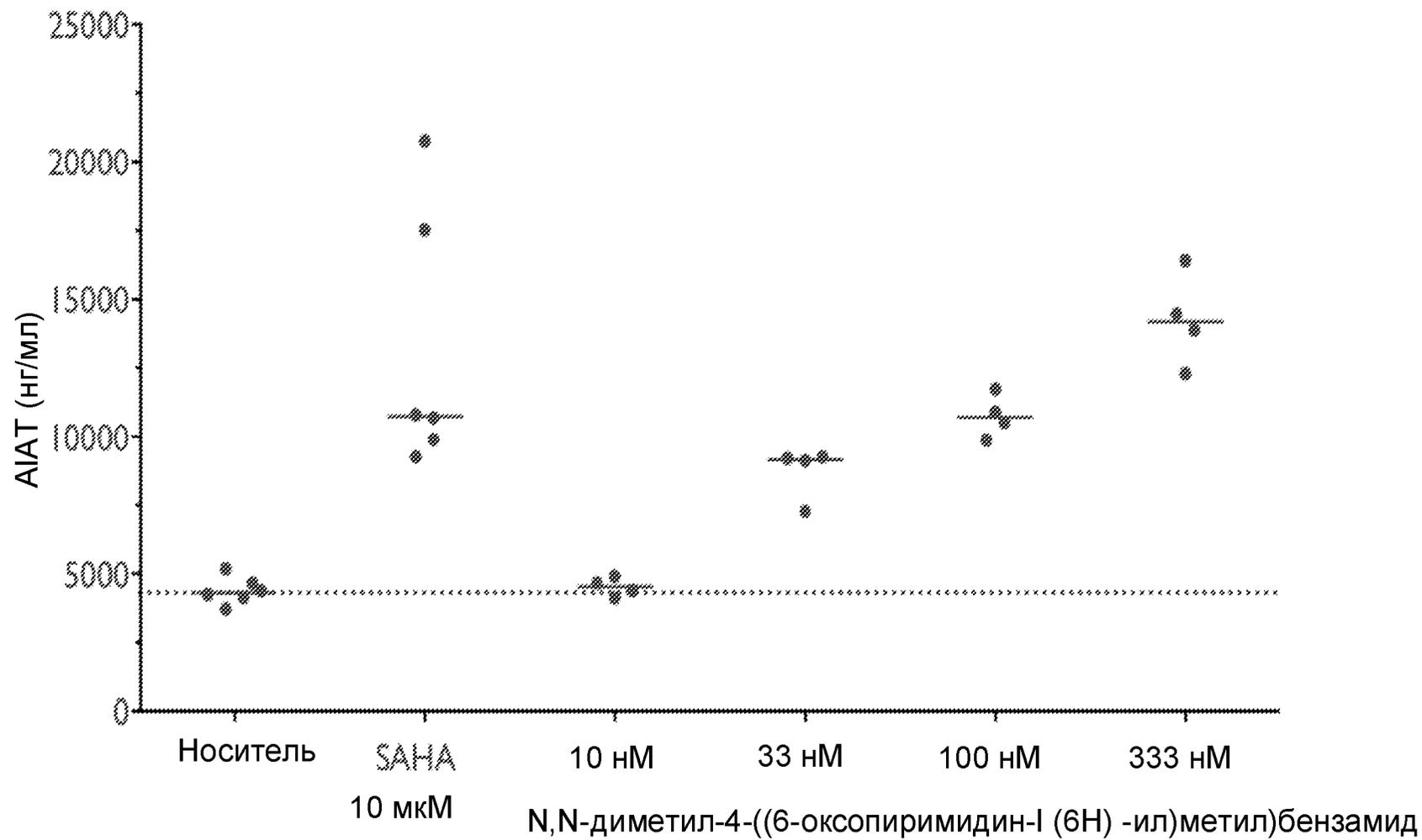
5 10. Применение соединения по любому из пп.1-4 для лечения заболевания или расстройства.

11. Применение по п.10 в качестве индуктора секреции Z A1AT.

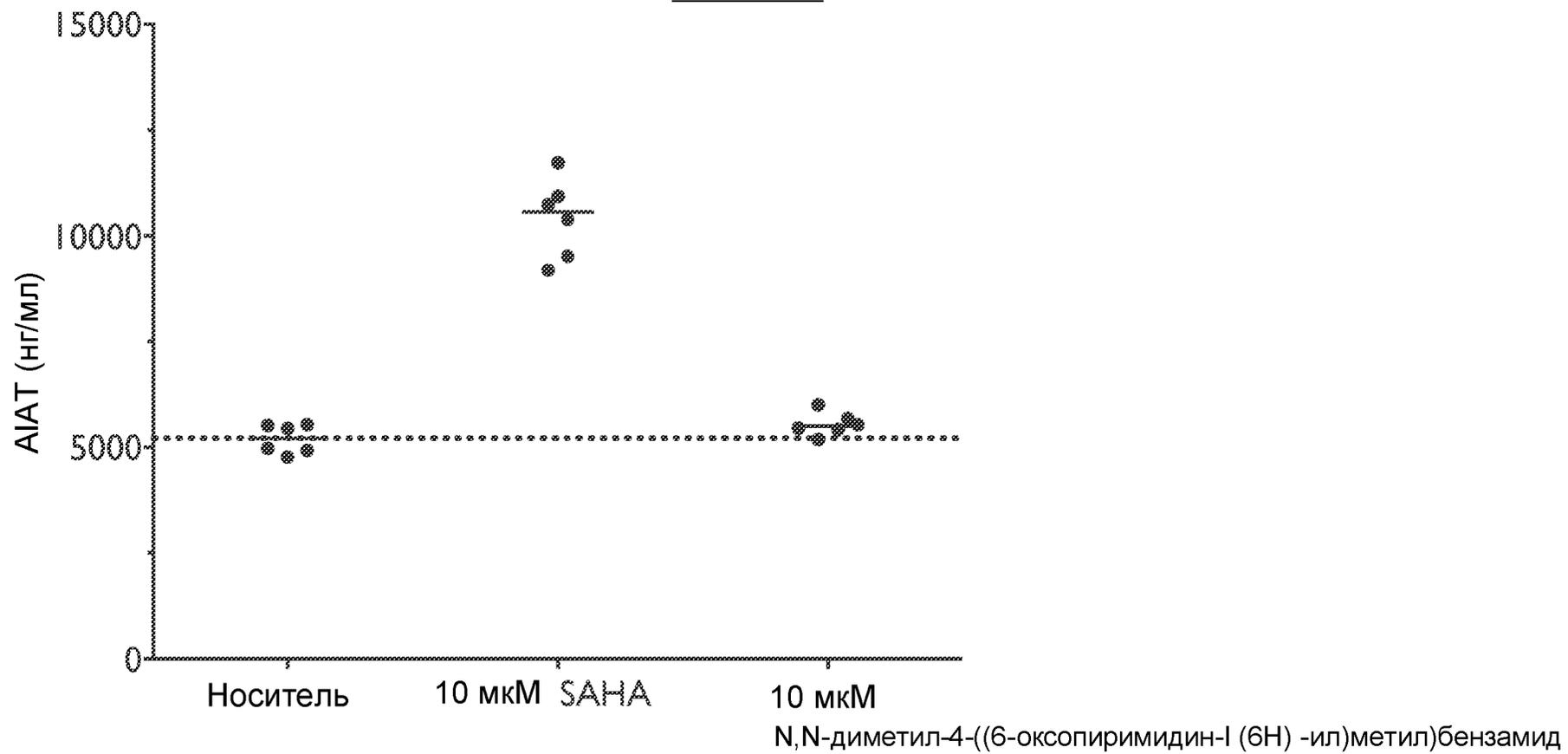
12. Применение по любому из пп.10 или 11, отличающееся тем, применение осуществляют *in vitro*.

10 13. Применение по п.6, соединение для применения по п.7, способ лечения по п.9 или применение по п.10-12, где заболевание или нарушение представляет собой дефицит α_1 -антитрипсина.

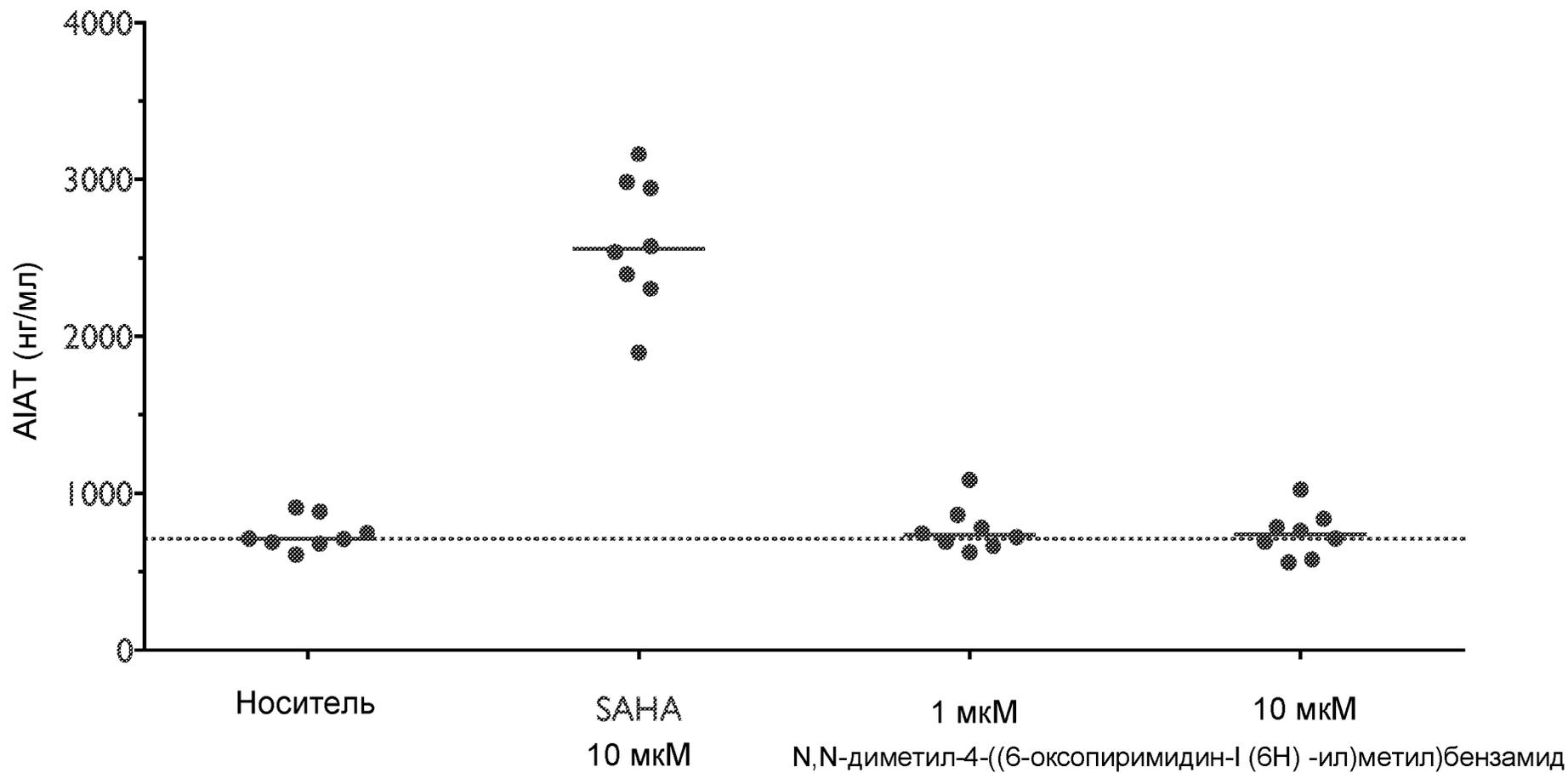
Фиг. 1

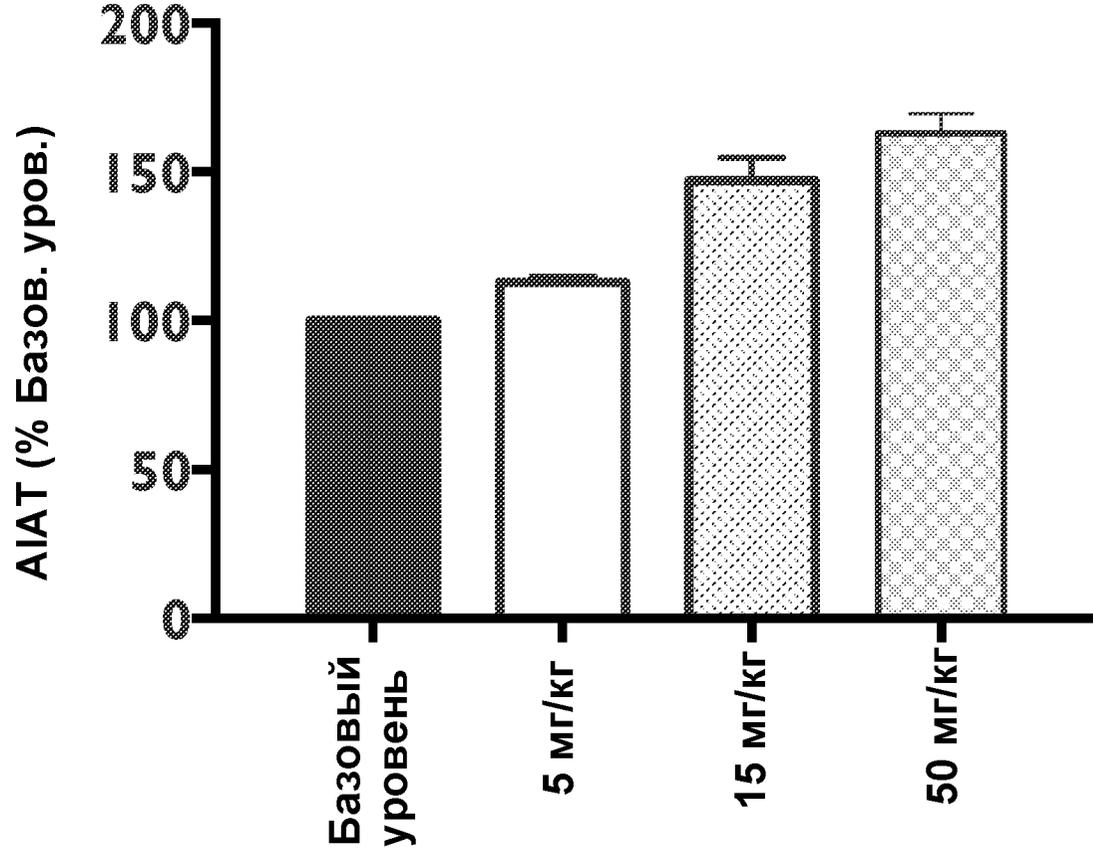


Фиг. 2



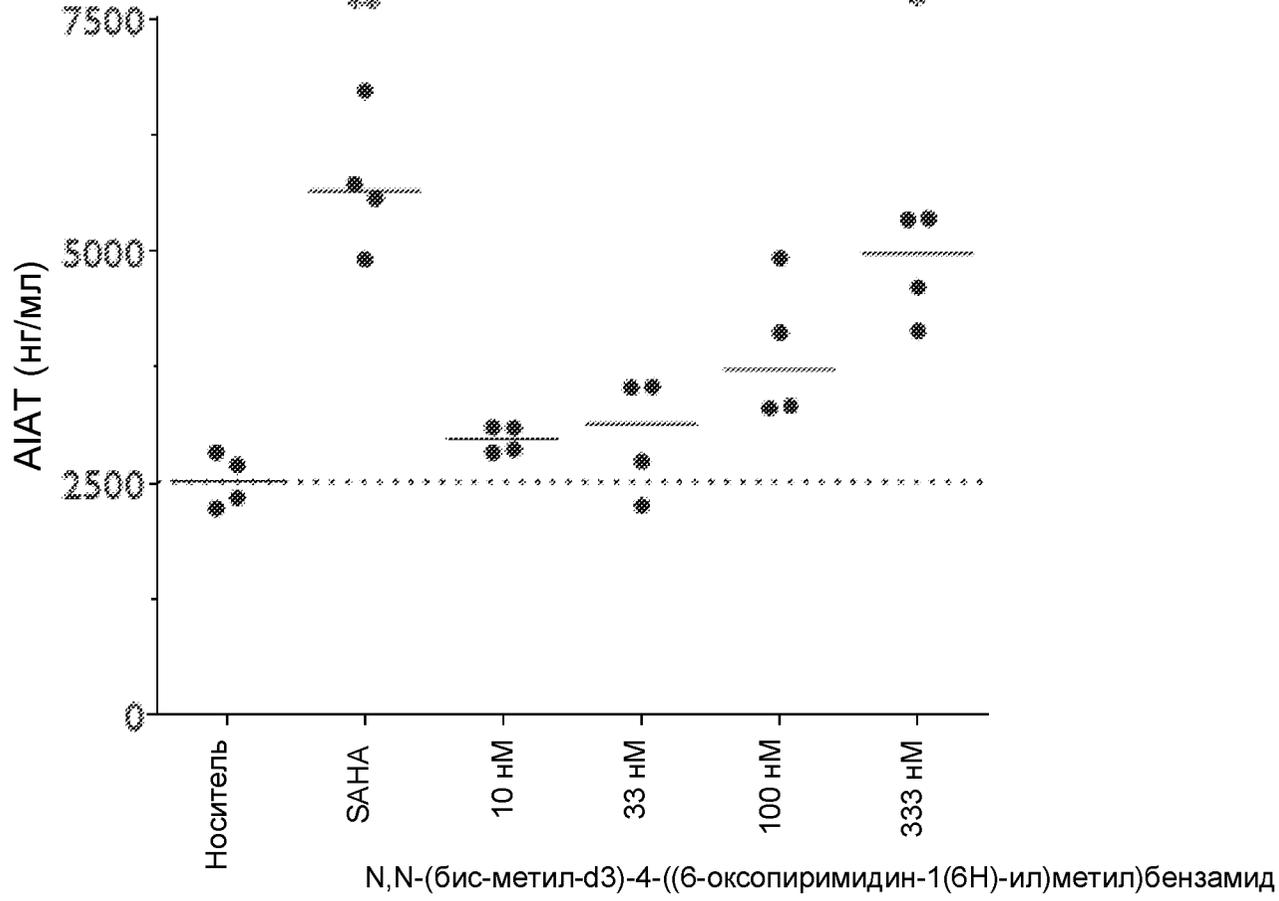
Фиг. 3



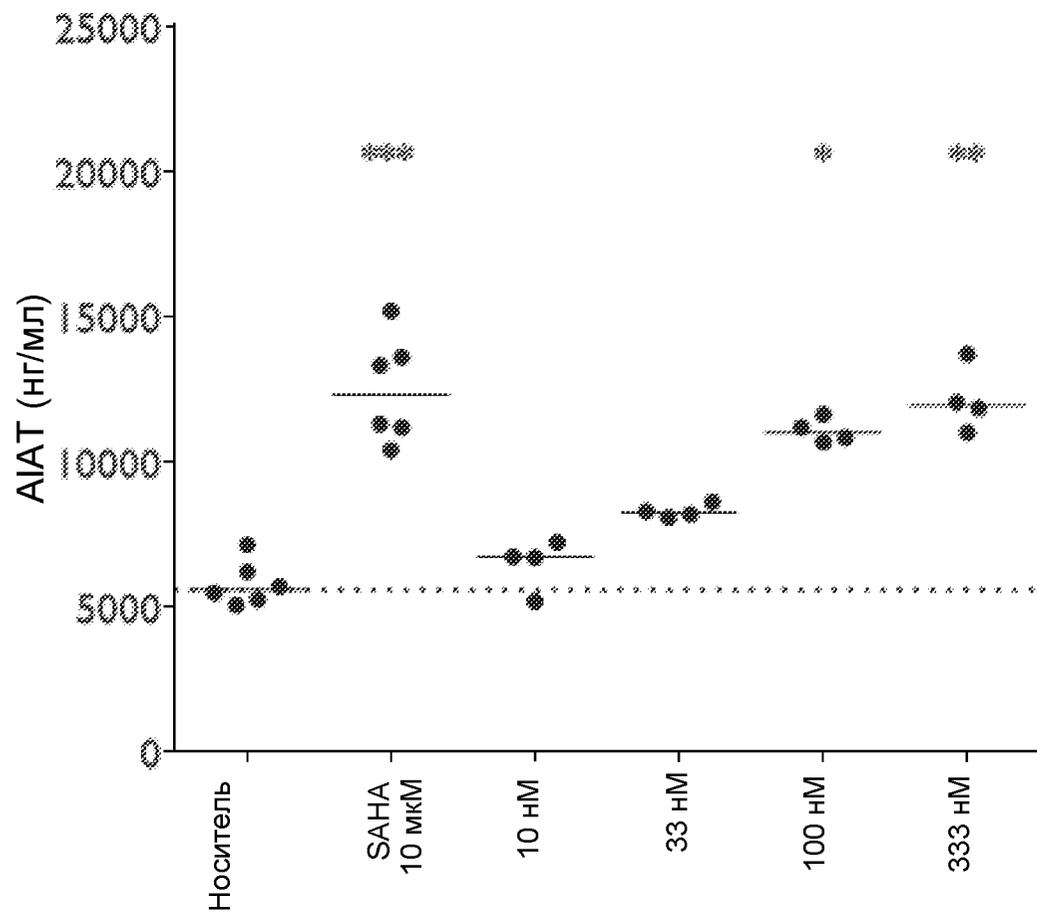
Фиг. 4

N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид

Фиг. 5

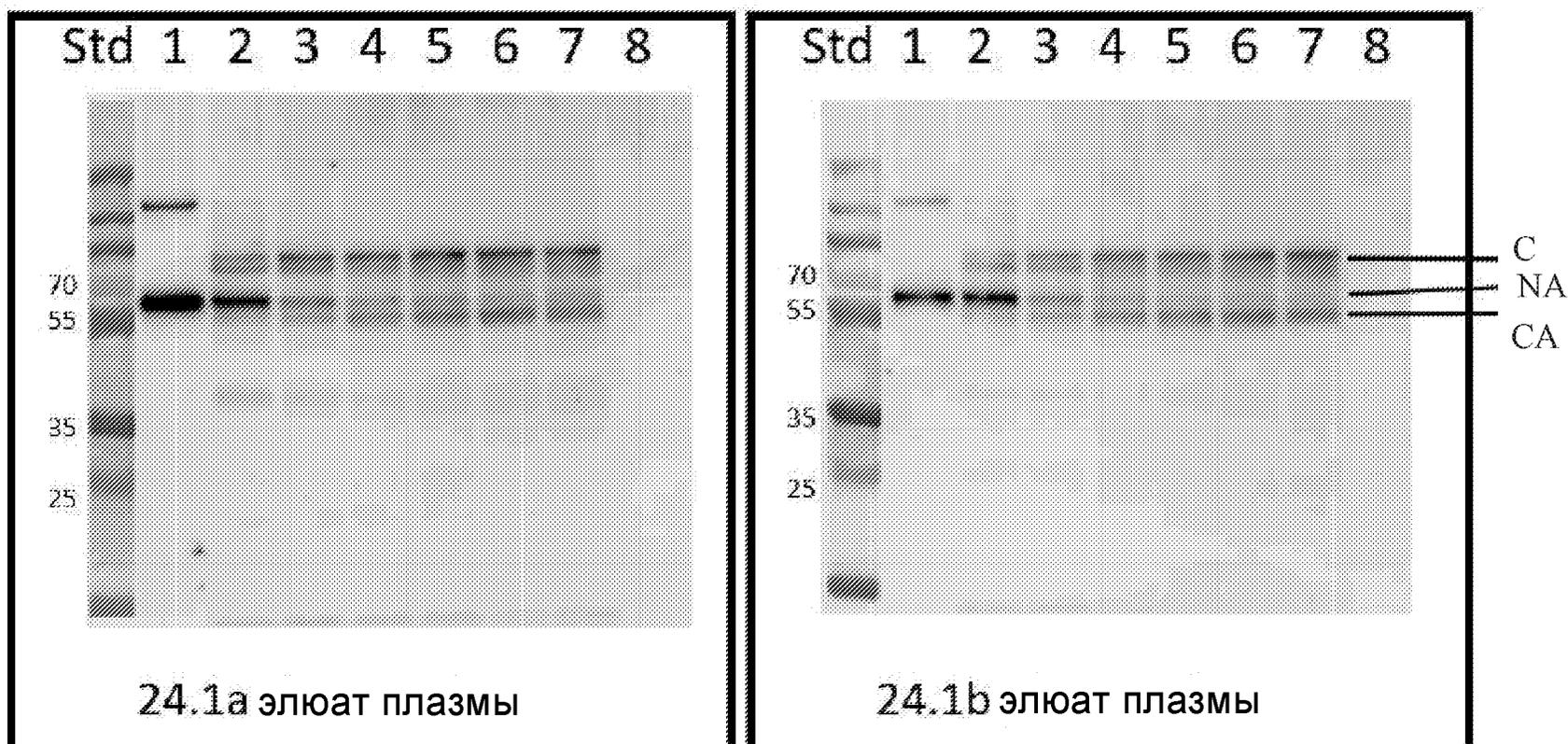


Фиг. 6



N,N-диметил-4-((6-оксопиримидин-1(6H)-ил)метил)бензамид

Фиг. 7А



Фиг. 7В

