

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **040280**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2022.05.17**

(21) Номер заявки  
**201990564**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.09.01**

(51) Int. Cl. **C07D 487/04** (2006.01)  
**C07D 471/04** (2006.01)  
**A61K 31/4985** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

**(54) КОНДЕНСИРОВАННЫЕ БИЦИКЛИЧЕСКИЕ СТИМУЛЯТОРЫ sGC**

(31) **62/382,942; 62/423,445; 62/468,598;  
62/482,486**

(32) **2016.09.02; 2016.11.17; 2017.03.08;  
2017.04.06**

(33) **US**

(43) **2019.09.30**

(86) **PCT/US2017/049834**

(87) **WO 2018/045276 2018.03.08**

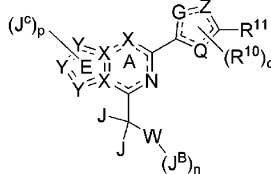
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**САЙКЛЕРИОН ТЕРАПЬЮТИКС,  
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Ренни Глен Роберт, Ийенгар  
Раджеш Р., Ли Томас Вай-Хо, Накан  
Такаси, Мермериан Ара, Джия Лэй,  
Им Г-Йоон Джамби, Ренхауэ Пол  
Аллан, Дзунг Дзоон, Джермано Питер,  
Айер Картик, Барден Тимоти Клод,  
Танг Ким (US)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) **WO-A2-2016044446  
WO-A1-2016087342**

(57) Изобретение относится к стимуляторам растворимой гуанилатциклазы (sGC), содержащим их фармацевтическим композициям и к их применению, по отдельности или в комбинации с одним или более дополнительными лекарственными средствами, для лечения различных заболеваний, в случае которых достигается положительный эффект в результате стимуляции sGC или повышения концентрации NO или cGMP, или и того и другого, или в результате повышения регуляции сигнального каскада NO. Соединения имеют формулу I



Формула I.

**B1****040280****040280****B1**

### Родственные заявки

Эта заявка в соответствии с разделом 35 119 (е) Свода законов США испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/382942, зарегистрированной 2 сентября 2016 г., предварительной заявки на патент США № 62/423445, зарегистрированной 17 ноября 2016 г., предварительной заявки на патент США № 62/468598, зарегистрированной 8 марта 2017 г., и предварительной заявки на патент США № 62/482486, зарегистрированной 6 апреля 2017 г.. Полное содержание каждой из упомянутых выше заявок включено в настоящее изобретение путем ссылки на нее.

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к стимуляторам растворимой гуанилатциклазы (sGC), к фармацевтическим композициям, включающим эти стимуляторы, и к применению этих стимуляторов при монотерапии или в комбинации с одним или более дополнительными лекарственными средствами для лечения различных заболеваний, при которых желательнее повышать концентрацию оксида азота (NO) или повышать концентрацию циклического гуанозин-3',5'-монофосфата (сGMP), или повышать концентрацию и того и другого, или повышать регуляцию сигнального каскада NO.

### Уровень техники

Растворимая гуанилатциклаза (sGC) является первичным сенсорным рецептором оксида азота (NO) *in vivo*. sGC может быть активирована как по NO-зависимому механизму, так и по NO-независимому механизму. В результате этой активации sGC превращает гуанозин-5'-трифосфат (GTP) во вторичный мессенджер циклический GMP (сGMP). Повышенный уровень сGMP, в свою очередь, модулирует активность нижележащих эффекторов, включающих протеинкиназы, фосфодиэстеразы (PDEs) и ионные каналы.

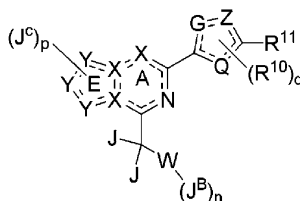
В организме NO образуется из аргинина и кислорода под воздействием различных ферментов синтаза оксида азота (NOS) и в результате последовательного восстановления неорганического нитрата. Были выявлены три четко различимые изоформы NOS: индуцибельная NOS (iNOS или NOS II), обнаруживаемая в активированных макрофагах; конститутивная нейрональная NOS (nNOS или NOS I), принимающая участие в передаче нервных импульсов и в долговременной потенциации синаптической передачи; и конститутивная эндотелиальная NOS (eNOS или NOS III), которая регулирует расслабление гладких мышц и кровяное давление. Данные экспериментальных и клинических исследований указывают на то, что уменьшение концентраций, снижение биодоступности и/или ответной реакции организма на эндогенно продуцируемый NO способствует развитию заболевания.

NO-независимые, гем-зависимые стимуляторы sGC отличаются от других типов модуляторов sGC несколькими важными характеристиками, включающими чрезвычайно сильную зависимость их активности от присутствия восстановленного простетического фрагмента тема, сильную синергетическую активацию фермента в сочетании с NO и стимулирование синтеза сGMP в результате непосредственного стимулирования sGC, независимого от NO. Соединение бензилиндазола YC-1 было первым идентифицированным стимулятором sGC. С тех пор были созданы и другие стимуляторы sGC с повышенной активностью и специфичностью в отношении sGC.

Соединения, которые стимулируют sGC по NO-независимому механизму, обладают значительными преимуществами по сравнению с другими применяемыми в настоящее время альтернативными лекарственными средствами, которые или целенаправленно воздействуют на aberrantный сигнальный каскад NO, или которые применяют при заболеваниях, в случае которых достигается положительный эффект в результате повышения регуляции сигнального каскада NO. Существует необходимость в создании новых стимуляторов sGC. Эти соединения могут применяться для лечения различных заболеваний, где заболевания или расстройства представляют собой заболевания или расстройства, в случае которых может достигаться положительный эффект в результате стимуляции sGC или повышения концентрации оксида азота (NO) или циклического гуанозин-3',5'-монофосфата (сGMP), или повышения концентрации и того и другого, или в случае которых желательнее повышение регуляции сигнального каскада NO.

### Сущность изобретения

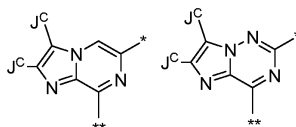
Настоящее изобретение относится к соединениям формулы I или его фармацевтически приемлемым солям



Формула I

где

кольца E и A образуют сердцевину молекулы и представлены следующими формулами:



где атом С с символом \* представляет точку присоединения к кольцу, содержащему G, Z и Q; и атом С с символом \*\* представляет точку присоединения 2 представителей J;

W является кольцом В, которое представляет собой фенил;

каждый J независимо выбирают из водорода или метила, n равен 1 и каждый J<sup>B</sup> представляет собой галоген;

r представляет собой целое число, выбранное из 1 или 2;

каждый J<sup>C</sup> независимо выбирают из водорода, галогена, C<sub>1-4</sub> алкила и -CN;

Q, G и Z, каждый независимо, представляет собой N;

q равен 0, 1 или 2;

R<sup>10</sup> представляет собой C<sub>1-6</sub> алкил, необязательно и независимо замещенный 0-3 представителями R<sup>15</sup>;

R<sup>11</sup> представляет собой H, -NR<sup>a2</sup>R<sup>b2</sup>, галоген, C<sub>1-6</sub> алкил, необязательно и независимо замещенный 0-3 представителями R<sup>15</sup>, 5-6-членный гетероарил, необязательно и независимо замещенный 0-3 представителями R<sup>15</sup>, C<sub>3-8</sub> циклоалкил, необязательно и независимо замещенный 0-3 представителями R<sup>15</sup>, где 5-6-членный гетероарил содержит до 3 кольцевых гетероатомов, независимо выбранных из N, O или S;

R<sup>15</sup> представляет собой галоген, -C(O)R<sup>b2</sup>, фенил,

необязательно и независимо замещенный 0-3 представителями R<sup>18</sup> или 5- или 6-членный гетероарил, необязательно и независимо замещенный 0-3 представителями R<sup>18</sup>, где каждое из 5- или 6-членного гетероарильного колец содержат до 3 кольцевых гетероатомов, независимо выбранных из N, O или S;

каждый R<sup>18</sup> независимо выбирают из галогена и C<sub>1-6</sub> алкила;

R<sup>a2</sup> представляет собой водород или C<sub>1-6</sub> алкил и

R<sup>b2</sup> представляет собой водород или C<sub>1-6</sub> алкил.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, включающей соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль и, по меньшей мере, одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество или носитель.

В изобретении также предлагается способ лечения или предотвращения заболевания, болезненного состояния или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли, где заболевание представляет собой заболевание, в случае которого достигается положительный эффект в результате стимуляции sGC или повышения концентрации NO или cGMP, или и того и другого, или в результате повышения регуляции сигнального каскада NO.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1 графически представлены данные по долговременной потенциации синаптической передачи в гиппокампальных срезах немутантных (WT) мышей (верхняя кривая), гиппокампальных срезах R6/2 мышей (нижняя кривая) и гиппокампальных срезах R6/2 мышей, подвергнутых лечению с помощью 7 нМ соединения I-1 (средняя кривая).

На фиг. 2 графически представлены данные по долговременной потенциации синаптической передачи в гиппокампальных срезах немутантных (WT) мышей (верхняя кривая, которая перекрывается со средней кривой), в гиппокампальных срезах R6/2 мышей (нижняя кривая) и гиппокампальных срезах R6/2 мышей, подвергнутых лечению с помощью 46 нМ соединения I-1 (средняя кривая, которая перекрывается с верхней кривой).

На фиг. 3 графически представлены данные по долговременной потенциации синаптической передачи в гиппокампальных срезах немутантных (WT) мышей (верхняя кривая, которая перекрывается со средней кривой), гиппокампальных срезах R6/2 мышей (нижняя кривая) и гиппокампальных срезах R6/2 мышей, подвергнутых лечению с помощью 308 нМ соединения I-1 (средняя кривая, которая перекрывается с верхней кривой).

На фиг. 4 приведено изображение мозга крысы, подвергнутой лечению с помощью стимулятора sGC типа ограниченного периферического действия (слева) и изображение мозга крысы, подвергнутой лечению с помощью соединения по изобретению (справа).

#### Подробное описание изобретения

Далее будут подробно описаны конкретные варианты осуществления изобретения, примеры которых проиллюстрированы в прилагаемых структурах и формулах. Несмотря на то, что изобретение будет описано во взаимосвязи с перечисленными вариантами осуществления, тем не менее, следует иметь в виду, что изобретение не ограничивается этими вариантами осуществления. Напротив, предполагается, что изобретение охватывает все альтернативные варианты, модификации и эквиваленты, которые могут быть включены в объем настоящего изобретения, определяемый формулой изобретения. Настоящее изо-

бретение не ограничивается способами и материалами, описанными в изобретении, и включает любые способы и материалы, подобные или эквивалентные способам и материалам, описанным в настоящем изобретении, которые могут быть использованы при осуществлении настоящего изобретения. В случае, если содержание одной или нескольких публикаций, патентов или аналогичных литературных источников, включенных в изобретение путем ссылки на них, отличается или находится в противоречии с содержанием этого изобретения, включая, но этим не ограничивая, определение терминов, использование терминов, описанные методики и другую подобную информацию, то содержание этого изобретения имеет преимущественную силу.

#### Определения и общая терминология

Применительно к этому изобретению, химические элементы указываются в соответствии с Периодической таблицей элементов в варианте реферативного журнала Chemical Abstract (CAS) и в соответствии со справочником Handbook of Chemistry and Physics, 75<sup>th</sup> Ed. 1994. Кроме того, общие принципы органической химии описаны в монографиях "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, и "March's Advanced Organic Chemistry", 5<sup>th</sup> Ed., Smith M. B. and March, J., eds. John Wiley & Sons, New York: 2001, содержание которых включено в настоящее изобретение путем ссылок на них.

Описанные в изобретении соединения формулы I могут быть необязательно замещены одним или более заместителями, которые проиллюстрированы в общих чертах ниже, или примерами которых являются конкретные классы, подклассы и виды заместителей, используемых в изобретении. Фраза "необязательно замещенный" используется взаимозаменяемо с фразой "замещенный или незамещенный". В общем случае, термин "замещенный" относится к замене одного или более водородных радикалов в данной структуре на радикал указанного заместителя. Если не указано иначе, то необязательно замещенная группа может иметь заместитель в каждом разрешенном для замещения положении в группе. В случае, когда более чем одно положение в данной структуре может быть замещено более чем одним заместителем, выбранным из указанной группы, заместитель может быть одним и тем же или отличающимся в каждом положении, если не указано иначе. Для описания такого случая может быть использован термин "необязательно и независимо". Например, одним описанным в изобретении заместителем является R<sup>10</sup>, который может представлять собой, наряду с другими вариантами, C<sub>1-6</sub> алкил, необязательно и независимо замещенный 0-3 представителями R<sup>15</sup>. В этом случае C<sub>1-6</sub> алкил может быть "необязательно замещенным": он может быть незамещенным (то есть, 0 присутствий R<sup>15</sup>) или замещенным (то есть, 1, 2 или 3 присутствия R<sup>15</sup>). В случае, когда имеет место множество присутствий R<sup>15</sup> (например, 2), каждый R<sup>15</sup> может быть одним и тем же заместителем (например, двумя атомами фтора) или отличающимся заместителем (например, -ОН или хлором). Для любого специалиста в этой области является очевидным, что такие группы как -H, галоген, -NO<sub>2</sub>, -CN, -OH, -NH<sub>2</sub> или -OCF<sub>3</sub> не могут быть способными к замещению группами.

Заместители и их комбинации, предлагаемые в этом изобретении, выбирают только из тех заместителей и их комбинаций, которые приводят к образованию стабильных или осуществимых с точки зрения химии соединений. Такой выбор заместителей и их комбинаций является очевидным для специалистов в этой области, и они могут сделать такой выбор без проведения ненужных в данном случае экспериментов. Используемый в изобретении термин "стабильные" относится к соединениям, которые практически не изменяются при воздействии условий, при которых их синтезируют, анализируют и, в некоторых вариантах осуществления, извлекают, очищают и применяют с одной или более из описанных в изобретении целями. В некоторых вариантах осуществления, стабильным соединением является соединение, которое практически не изменяется в процессе хранения при температуре 25°C или менее, в отсутствие влаги или других условий возможности протекания химического взаимодействия в течение, по меньшей мере, недели. Осуществимым с точки зрения химии соединением является соединение, которое может быть синтезировано специалистом в соответствующей области, использующим раскрытые в изобретении сведения и, если требуется, соответствующие знания в этой области.

Соединение, такое как соединения формулы I или соединения из табл. I или другие описанные в изобретении соединения, может присутствовать в свободной форме (например, аморфной форме или кристаллической форме, или в форме полиморфа). При определенных условиях, соединения могут также образовывать коформы. Используемый в изобретении термин "коформа" является синонимом термина "многокомпонентная кристаллическая форма". Образование соли определяется тем, насколько большим является различие в величинах рКа компонентов, образующих смесь. Применительно к этому изобретению, соединения включают их фармацевтически приемлемые соли, даже если термин "фармацевтически приемлемые соли" в явном виде в тексте не указывается.

За исключением тех случаев, когда конкретно изображен и указан только один из изомеров, подразумевается, что изображенные в изобретении структуры также включают все стереоизомерные (например, энантиомерные, диастереомерные, атропоизомерные и цис-транс-изомерные) формы структуры, например, R и S конфигурации для каждого центра асимметрии, Ra и Sa конфигурации для каждой оси асимметрии, (Z) и (E) конфигурации двойной связи, и цис- и транс- конформационные изомеры. Поэтому, индивидуальные стереохимические изомеры, а также рацематы и смеси энантиомеров, диастереомеров и цис-транс-изомеров (по двойной связи или конформационных) описанных соединений входят в

объем настоящего изобретения. Если не указано иначе, то все таутомерные формы соединений по настоящему изобретению также входят в объем изобретения.

Настоящее изобретение также включает изотопно-меченые соединения, которые идентичны описанным в изобретении соединениям, но в которых один или более атомов заменены на атом, имеющий атомную массу или массовое число, отличное от атомной массы или массового числа, обычно встречающихся в природе. Предполагается, что все изотопы любого указанного конкретно атома или элемента входят в состав соединений по изобретению и используются при применении этих соединений. Примеры изотопов, которые могут быть введены в соединения по изобретению, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, серы, фтора, хлора и йода, такие как  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{123}\text{I}$  и  $^{125}\text{I}$  соответственно. Конкретные изотопно-меченые соединения по настоящему изобретению (например, соединения, меченные  $^3\text{H}$  и  $^{14}\text{C}$ ) могут применяться при исследовании распределения соединения и/или субстрата в тканях. Использование соединений, меченных тритием (то есть,  $^3\text{H}$ ) и углеродом-14 (то есть,  $^{14}\text{C}$ ), связано с легкостью их приготовления и возможности детектирования. Кроме того, замещение более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий (например,  $^2\text{H}$ ), может давать определенные терапевтические преимущества, обусловленные более высокой метаболической стабильностью (например, увеличением периода полувыведения *in vivo* или уменьшением необходимого уровня дозирования) и, следовательно, может быть предпочтительным в некоторых обстоятельствах. Позитрон-излучающие изотопы, такие как  $^{15}\text{O}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{11}\text{C}$  и  $^{18}\text{F}$ , могут применяться при исследованиях с помощью позитронно-эмиссионной томографии (PET) для определения степени занятости рецептора субстратом. Изотопно-меченые соединения по настоящему изобретению могут быть получены, в большинстве случаев, в соответствии с методиками, аналогичными методикам, описанным в схемах и/или примерах ниже, путем замены реагента, не меченного изотопом, на изотопно-меченый реагент.

Используемый в изобретении термин "алифатический" или "алифатическая группа" или "алифатическая углеводородная цепь" обозначает линейную (то есть, неразветвленную) или разветвленную, замещенную или незамещенную углеводородную цепь, которая является полностью насыщенной или которая содержит один или более элементов ненасыщенности. Если не указано иначе, то алифатические группы содержат 1-20 алифатических углеродных атомов. В некоторых вариантах осуществления алифатические группы содержат 1-10 алифатических углеродных атомов. В других вариантах осуществления алифатические группы содержат 1-8 алифатических углеродных атомов. В еще одних вариантах осуществления алифатические группы содержат 1-6 алифатических углеродных атомов. В других вариантах осуществления алифатические группы содержат 1-4 алифатических углеродных атомов, и в еще одних вариантах осуществления алифатические группы содержат 1-3 или 1-2 алифатических углеродных атомов. Подходящие алифатические группы включают, но эти не ограничивая, линейные или разветвленные, замещенные или незамещенные алкильные, алкенильные или алкинильные группы. Конкретные примеры алифатических групп включают, но эти не ограничивая, метил, этил, пропил, бутил, изопропил, изобутил, винил, вторбутил, трет-бутил, бутенил, пропаргил, ацетилен и другие подобные алифатические группы. Алифатическая группа будет представлена термином " $\text{C}_{x-y}$  алифатическая углеводородная цепь", где  $x$  и  $y$  представляют собой минимальное и максимальное число углеродных атомов, образующих алифатическую углеводородную цепь.

Используемый в изобретении термин "алкил" (как например в "алкильной цепи" или "алкильной группе") относится к насыщенному одновалентному углеводородному радикалу с линейной или разветвленной цепью. Если не указано иначе, то алкильная группа содержит 1-20 углеродных атомов (например, 1-20 углеродных атомов, 1-10 углеродных атомов, 1-8 углеродных атомов, 1-6 углеродных атомов, 1-4 углеродных атомов или 1-3 углеродных атомов). Примеры алкильных групп включают, но этим не ограничивая, метил, этил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, изобутил, вторбутил, третбутил, пентил, гексил, гептил, октил и другие подобные алкильные группы. Алкильная группа будет представлена термином " $\text{C}_{x-y}$  алкил", где  $x$  и  $y$  представляют собой минимальное и максимальное число углеродных атомов, образующих алкильную цепь.

Используемый в изобретении термин "циклоалкил" или "циклоалкильное кольцо" относится к кольцевой системе, которая является полностью насыщенной и которая имеет единственную точку присоединения к остальной части молекулы. В одном варианте осуществления, термин "циклоалкил" относится к моноциклическому  $\text{C}_{3-12}$  насыщенному углеводороду. Подходящие циклоалкильные группы включают, но этим не ограничивая, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил, циклогептенил, норборнил, циклооктил, циклононил, циклодецил, циклоундецил, циклододецил и другие подобные группы. Циклоалкильное кольцо будет представлено термином " $\text{C}_{x-y}$  циклоалкил", где  $x$  и  $y$  представляют собой минимальное и максимальное число углеродных атомов, образующих циклоалкильное кольцо.

Используемый в изобретении термин "гетероцикл" (или "гетероциклил" или "гетероциклический" или "гетероциклическое кольцо") относится к кольцевой системе, в которой один или более членов кольца представляют собой независимо выбранный гетероатом, которая является полностью насыщенной или которая содержит один или более элементов ненасыщенности, но которая не является ароматической и которая имеет единственную точку присоединения к остальной части молекулы. Если не указано иначе,

то, в настоящем изобретении, термин "гетероцикл" используют в качестве синонима "неароматического гетероцикла". В некоторых случаях термин может быть использован в выражении "ароматический гетероцикл", и в этом случае он будет обозначать "гетероарильную группу", определяемую ниже. В некоторых вариантах осуществления гетероцикл имеет 3-10 членов в кольце, где один или более членов кольца представляют собой гетероатом, независимо выбранный из кислорода или азота. В других вариантах осуществления гетероцикл может представлять собой моноцикл, имеющий 3-7 членов в кольце (2-6 углеродных атомов и 1-4 гетероатомов).

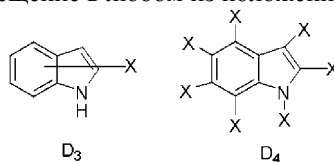
Примеры гетероциклических колец включают, но этим не ограничивая, следующие моноциклы: 2-тетрагидрофуранил, 3-тетрагидрофуранил, 2-тетрагидротииофенил, 3-тетрагидротииофенил, 2-морфолино, 3-морфолино, 4-морфолино, 2-тиоморфолино, 3-тиоморфолино, 4-тиоморфолино, 1-пирролидинил, 2-пирролидинил, 3-пирролидинил, 1-тетрагидропиперазинил, 2-тетрагидропиперазинил, 3-тетрагидропиперазинил, 1-пиперидинил, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 1-пиразолинил, 3-пиразолинил, 4-пиразолинил, 5-пиразолинил, 1-пиперидинил, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 4-пиперидинил, 2-тиазолидинил, 3-тиазолидинил, 4-тиазолидинил, 1-имидазолидинил, 2-имидазолидинил, 4-имидазолидинил, 5-имидазолидинил.

Термин "гетероарил" (или "гетероароматический", или "гетероарильная группа", или "ароматический гетероцикл" или "гетероарильное кольцо"), используемый как таковой или как часть более крупного фрагмента, как например в "гетероарилалкиле" или "гетероарилалкокси", относится к кольцу, которое является ароматическим и содержит один или более гетероатомов, имеет от 5 до 6 членов в кольце, и которое имеет единственную точку присоединения к остальной части молекулы. Гетероарильные кольца включают, но этим не ограничивая, следующие моноциклы: 2-фуранил, 3-фуранил, N-имидазолил, 2-имидазолил, 4-имидазолил, 5-имидазолил, 3-изоксазолил, 4-изоксазолил, 5-изоксазолил, 2-оксазолил, 4-оксазолил, 5-оксазолил, N-пирролил, 2-пирролил, 3-пирролил, 2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил, 2-пиримидинил, 4-пиримидинил, 5-пиримидинил, пиридазинил (например, 3-пиридазинил), 2-тиазолил, 4-тиазолил, 5-тиазолил, тетразолил (например, 5-тетразолил), триазолил (например, 2-тиазолил и 5-триазолил), 2-тиенил, 3-тиенил, пиразолил (например, 2-пиразолил), изотиазолил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,2,5-оксадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,2,3-триазолил, 1,2,3-тиадиазолил, 1,3,4-тиадиазолил, 1,2,5-тиадиазолил, пиазинил, 1,3,5-триазинил.

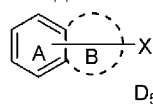
Термин "кольцевой атом" относится к атому, такому как С, N, O или S, который является частью кольца ароматической группы, циклоалифатического кольца, гетероциклического или гетероарильного кольца. "Способный к замещению кольцевой атом" представляет собой кольцевой атом углерода или азота, соединенный по меньшей мере с одним атомом водорода. Водород может быть необязательно замещен с помощью подходящей замещающей группы. Поэтому термин "способный к замещению кольцевой атом" не включает кольцевые атомы азота или углерода, которые являются общими в случае, когда два кольца являются конденсированными. Кроме того, "способный к замещению кольцевой атом" не включает кольцевые атомы углерода или азота в случае, когда в структуре изображено, что они уже присоединены к одному или более фрагментам, не являющимися водородом, и отсутствуют водороды, доступные для замещения.

Термин "гетероатом" относится к одному или нескольким атомам кислорода, серы, азота, фосфора или кремния, в том числе к любой окисленной форме азота, серы, фосфора или кремния, кватернизированной форме любого основного азота или способного к замещению азота гетероциклического или гетероарильного кольца, например N (как например в 3,4-дигидро-2H-пирролиле), NH (как например в пирролидиниле) или NR<sup>+</sup> (как например в N-замещенном пирролидиниле).

Описанная в изобретении химическая связь, направленная от заместителя к центру одного кольца в многокольцевой системе (как показано ниже), представляет замещение с помощью заместителя в любом способном к замещению положении в любом из колец в многокольцевой системе. Например, в формуле D3 продемонстрировано возможное замещение в любом из положений, показанных в формуле D4:

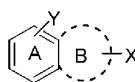


Это также применимо к многокольцевым системам, конденсированным с необязательными кольцевыми системами (которые могут изображаться пунктирными линиями). Например, в формуле D5, X представляет собой необязательный заместитель как для кольца A, так и для кольца B.



Однако, если два кольца в многокольцевой системе каждое имеет различные заместители, изображаемые из центра каждого кольца, то тогда, если не указано иначе, каждый заместитель представляет только замещение на кольце, к которому он присоединен. Например, в формуле D6 Y представляет собой

необязательный заместитель только для кольца А, а X представляет собой необязательный заместитель только для кольца В.



D<sub>6</sub>

Используемые в изобретении термины "галоген" или "гало" обозначают F, Cl, Br или I.

Термины "галогеналкил", "галогеналкенил", "галогеналифатическая группа" и "галогеналкокси" обозначают, в зависимости от конкретного случая, алкил, алкенил, алифатическую углеводородную цепь или алкокси, замещенные одним или более атомами галогена. Например, C<sub>1-3</sub> галогеналкил может представлять собой -CFHCH<sub>2</sub>CHF<sub>2</sub>, а C<sub>1-2</sub> галогеналкокси может представлять собой -OC(Br)HCHF<sub>2</sub>. Этот термин включает перфорированные алкильные группы, такие как -CF<sub>3</sub> и CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>.

Используемый в изобретении термин "циано" относится к -CN или -C≡N.

Термины "цианоалкил", "цианоалкенил", "цианоалифатическая группа" и "цианоалкокси" обозначают, в зависимости от конкретного случая, алкил, алкенил, алифатическую группу или алкокси, замещенные одной или более цианогруппами. Например, C<sub>1-3</sub> цианоалкил может представлять собой -C(CN)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, а C<sub>1-2</sub> цианоалкенил может представлять собой =CHC(CN)H<sub>2</sub>.

Используемый в изобретении термин "аминогруппа" обозначает -NH<sub>2</sub>.

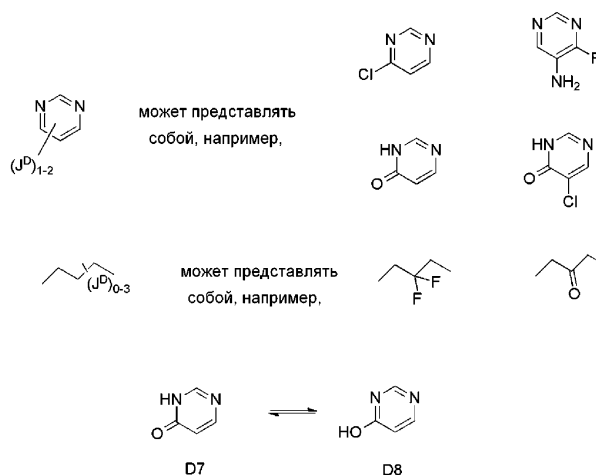
Термины "аминоалкил", "аминоалкенил", "аминоалифатическая группа" и "аминоалкокси" обозначают, в зависимости от конкретного случая, алкил, алкенил, алифатическую группу или алкокси, замещенные одной или более аминогруппами. Например, C<sub>1-3</sub> аминоалкил может представлять собой -CH(NH<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, а C<sub>1-2</sub> аминоалкокси может представлять собой -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.

Термин "гидроксил" или "гидрокси" обозначает группу -OH.

Термины "гидроксиалкил", "гидроксиалкенил", "гидроксиалифатическая группа" и "гидроксиалкокси" обозначают, в зависимости от конкретного случая, алкил, алкенил, алифатическую группу или алкокси, замещенные одной или более группами -OH. Например, C<sub>1-3</sub> гидроксиалкил может представлять собой -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>OH)CH<sub>3</sub>, а C<sub>4</sub> гидроксиалкокси может представлять собой -OCH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)(OH)CH<sub>3</sub>.

Используемый в изобретении термин "карбонил", сам по себе или применительно к другой группе, обозначает -C(O)- или -C(O)H. Например, используемый в изобретении термин "алкоксикарбонил" обозначает такую группу, как -C(O)O(алкил).

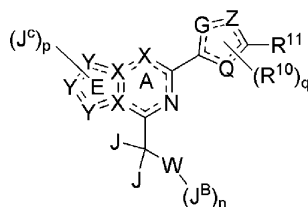
Используемый в изобретении термин "оксо" обозначает =O, где "оксо", как правило, но не всегда, присоединен к углеродному атому (например, он может быть также присоединен к атому серы). Алифатическая цепь может необязательно прерываться карбонильной группой или может быть необязательно замещена оксогруппой, и оба эти описания обозначают одно и ту же алифатическую цепь, например, -CH<sub>2</sub>-C(O)-CH<sub>3</sub>. Когда "оксогруппу" упоминают в качестве возможного заместителя на кольце или на другом фрагменте или группе (например, на алкильной цепи), следует иметь в виду, что химическая связь между кислородом в указанной оксогруппе и кольцом или фрагментом, к которому оксогруппа присоединена, является двойной связью, даже если иногда эту связь изображают в общем с помощью одиночной линии. Например, в изображенном ниже примере, J<sup>D</sup>, присоединенный к кольцу, может быть выбран из целого ряда различных заместителей. В случае, когда J<sup>D</sup> представляет собой оксо, следует иметь в виду, что связь между J<sup>D</sup> и кольцом является двойной связью. В случае, когда J<sup>D</sup> представляет собой галоген, следует иметь в виду, что связь между J<sup>D</sup> и кольцом является одинарной связью. В некоторых случаях, например, когда кольцо содержит ненасыщенность или, когда оно характеризуется ароматическими свойствами, соединение может существовать в двух или более возможных таутомерных формах. В одной из этих форм, связь между оксогруппой и кольцом является двойной связью. В другой форме, водородная связь будет рекомбинирована между атомами и заместителями в кольце, в результате чего оксо превращается в гидрокси и образуется дополнительная двойная связь в кольце. Принимая во внимание, что соединения изображают как D7 или D8, считается, что оба изображения представляют набор всех возможных таутомеров для этого конкретного соединения.



Во всех других случаях, используемый в изобретении термин "связующее звено" обозначает двухвалентную группу, в которой две свободные валентности находятся на разных атомах (например, на углероде или гетероатоме) или находятся на одном и том же атоме, но могут быть замещены двумя различными заместителями. Например, метиленовая группа может представлять собой  $C_1$  алкильное связующее звено ( $-CH_2-$ ), которое может быть замещено двумя различными группами, по одной на каждую свободную валентности (например, как в  $Ph-CH_2-Ph$ , где метилен действует как связующее звено между двумя фенильными кольцами). Этилен может представлять собой  $C_2$  алкильное связующее звено ( $-CH_2CH_2-$ ), в котором две свободные валентности находятся на различных атомах. Амидная группа, например, может выполнять функцию связывающего звена, когда ее размещают внутри цепи (например,  $-CONH-$ ). Соединения по изобретению определяют в изобретении с помощью их химических структур и/или химических названий. В случае, когда изобретение определяют одновременно и с помощью химической структуры, и с помощью химического названия, и химическая структура и химическое название противоречат друг другу, химическая структура являются определяющей при идентификации соединения.

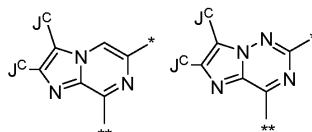
### Варианты осуществления изобретения

Настоящее изобретение относится к соединениям формулы I или его фармацевтически приемлемым солям



Формула I

где кольца E и A образуют сердцевину молекулы и представлены следующими формулами:



где атом C с символом \* представляет точку присоединения к кольцу, содержащему G, Z и Q; и

атом C с символом \*\* представляет точку присоединения 2 представителей J;

W является кольцом B, которое представляет собой фенил;

каждый J независимо выбирают из водорода или метила, n равен 1 и каждый  $J^B$  представляет собой галоген;

r представляет собой целое число, выбранное из 1 или 2;

каждый  $J^C$  независимо выбирают из водорода, галогена,  $C_{1-4}$  алкила и  $-CN$ ;

Q, G и Z, каждый независимо, представляет собой N;

q равен 0, 1 или 2;

$R^{10}$  представляет собой  $C_{1-6}$  алкил, необязательно и независимо замещенный 0-3 представителями  $R^{15}$ ,

$R^{11}$  представляет собой H,  $-NR^{a2}R^{b2}$ , галоген,  $C_{1-6}$  алкил, необязательно и независимо замещенный 0-3 представителями  $R^{15}$ , 5-6-членный гетероарил, необязательно и независимо замещенный 0-3 представителями  $R^{15}$ ,  $C_{3-8}$  циклоалкил, необязательно и независимо замещенный 0-3 представителями  $R^{15}$ , где 5-6-членный гетероарил содержит до 3 кольцевых гетероатомов, независимо выбранных из N, O или S;



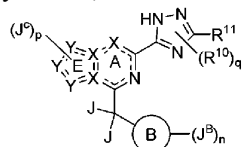
$R^{15}$  представляет собой галоген,  $-C(O)R^{b2}$ , фенил, необязательно и независимо замещенный 0-3 представителями  $R^{18}$  или 5- или 6-членный гетероарил, необязательно или независимо замещенный 0-3 представителями  $R^{18}$ , где каждое из 5- или 6-членного гетероарильного колец содержат до 3 кольцевых гетероатомов, независимо выбранных из N, O или S;

каждый  $R^{18}$  независимо выбирают из галогена и  $C_{1-6}$  алкила;

$R^{a2}$  представляет собой водород или  $C_{1-6}$  алкил; и

$R^{b2}$  представляет собой водород или  $C_{1-6}$  алкил.

В некоторых вариантах осуществления формулы I соединение представляет собой соединение формулы III или его фармацевтически приемлемую соль, или любой из его таутомеров



Формула III.

В некоторых вариантах осуществления формулы I  $J^B$  находится в ортоположении относительно присоединения метиленового связующего звена между кольцом B и сердцевиной молекулы.

В некоторых вариантах осуществления формулы I или формулы III, соединение представляет собой соединение или его фармацевтически приемлемую соль, где

J представляет собой водород;

$J^C$  представляет собой водород;

$R^{10}$  представляет собой  $C_{1-4}$  алкил, необязательно замещенный 1, 2 или 3 группами, независимо выбранными из галогена,  $-C(O)R^{b2}$ , фенила и 5- или 6-членного гетероарила, где фенил и 5- или 6-членный гетероарил необязательно замещены 1, 2 или 3 галогенами или  $C_{1-4}$  алкилами, где гетероарил включает 1, 2 или 3 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S;

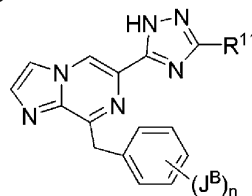
q равен 0 или 1;

$R^{11}$  представляет собой H, галоген,  $-NR^{a2}R^{b2}$ ,  $C_{1-4}$  алкил, 5-6-членный гетероарил или  $C_{3-6}$  циклоалкил, где каждый  $C_{1-4}$  алкил, 5-6-членный гетероарил и  $C_{3-6}$  циклоалкил необязательно замещен 1, 2 или 3 представителями  $R^{15}$ , где  $R^{15}$  представляет собой галоген, и где гетероарил включает 1, 2 или 3 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S;

$R^{a2}$  представляет собой водород или  $C_{1-4}$  алкил и

$R^{b2}$  представляет собой водород или  $C_{1-4}$  алкил.

В некоторых вариантах осуществления формулы I соединение представляет собой соединение формулы VI или его фармацевтически приемлемую соль



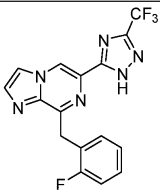
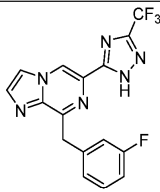
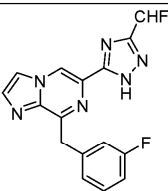
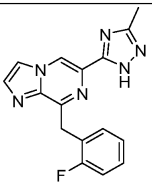
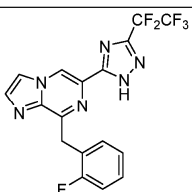
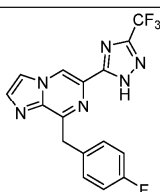
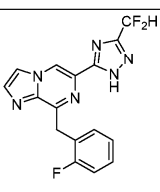
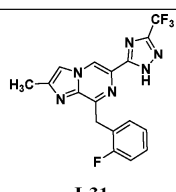
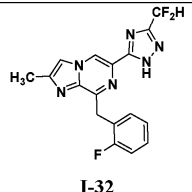
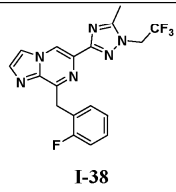
Формула VI

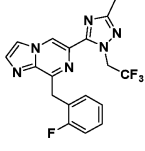
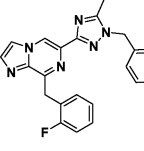
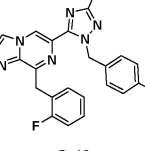
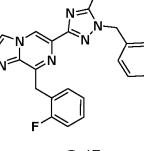
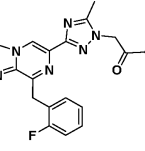
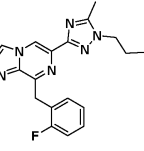
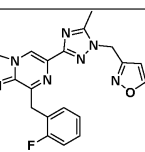
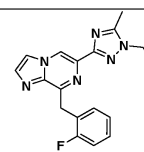
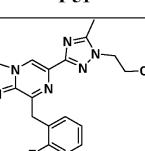
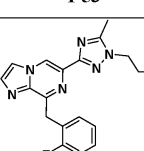
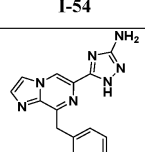
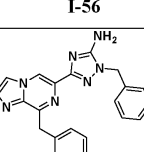
где

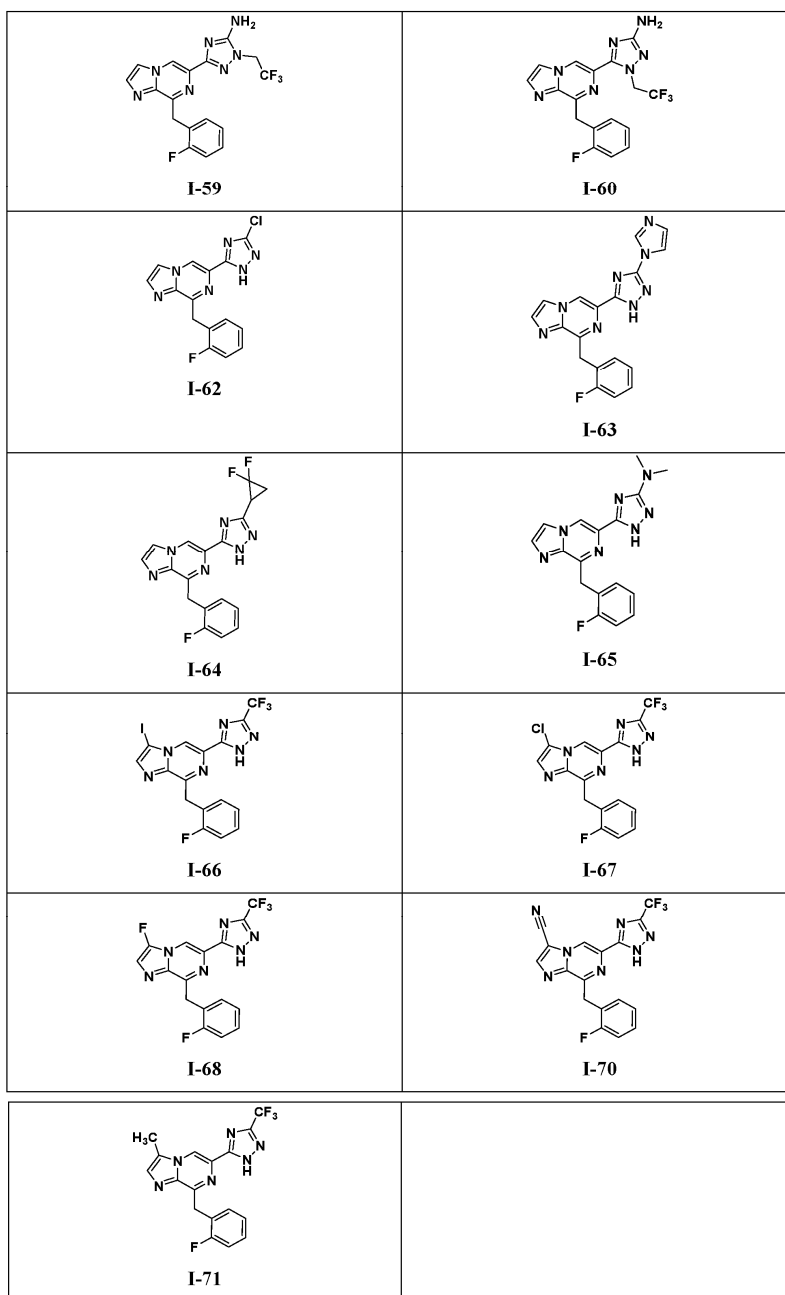
$R^{11}$  представляет собой H, галоген,  $-NR^{a2}R^{b2}$ ,  $C_{1-4}$  алкил, 5-6-членный гетероарил или  $C_{3-6}$  циклоалкил, где каждый  $C_{1-4}$  алкил, 5-6-членный гетероарил и  $C_{3-6}$  циклоалкил необязательно замещен 1, 2 или 3 группами, независимо выбранных из галогена;

$R^{a2}$  представляет собой водород или  $C_{1-4}$  алкил.

В некоторых вариантах осуществления, соединения формулы I выбирают из соединений, приведенных в табл. I.

 <p><b>I-1</b></p>	 <p><b>I-2</b></p>
 <p><b>I-3</b></p>	 <p><b>I-4</b></p>
 <p><b>I-5</b></p>	 <p><b>I-12</b></p>
 <p><b>I-14</b></p>	 <p><b>I-31</b></p>
 <p><b>I-32</b></p>	 <p><b>I-38</b></p>

 <p><b>I-39</b></p>	 <p><b>I-41</b></p>
 <p><b>I-42</b></p>	 <p><b>I-47</b></p>
 <p><b>I-48</b></p>	 <p><b>I-50</b></p>
 <p><b>I-51</b></p>	 <p><b>I-53</b></p>
 <p><b>I-54</b></p>	 <p><b>I-56</b></p>
 <p><b>I-57</b></p>	 <p><b>I-58</b></p>



В некоторых вариантах осуществления, соединение формулы I находится или в нейтральной форме, или в форме фармацевтически приемлемой соли.

#### Фармацевтически приемлемые соли по изобретению

Используемый в изобретении термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям соединения формулы I. Фармацевтически приемлемые соли соединения формулы I применяют в медицине. Однако соли, которые не являются фармацевтически приемлемыми, могут использоваться при получении соединения формулы I или его фармацевтически приемлемых солей. Фармацевтически приемлемая соль может включать в себя другую молекулу, такую как ацетат-ион, сукцинат-ион или другой противоион. Противоион может представлять собой любой органический или неорганический фрагмент, который нейтрализует заряд на исходном соединении. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может иметь в своей структуре более чем один несущий заряд атом. В случаях, когда многозарядные атомы входят в состав фармацевтически приемлемой соли, такая соль может иметь несколько противоионов. Поэтому фармацевтически приемлемая соль может иметь один или более заряженных атомов и/или один или более противоионов.

Описанные в изобретении фармацевтически приемлемые соли соединений включают соли, образованные соединениями с неорганическими кислотами, органическими кислотами или основаниями. В некоторых вариантах осуществления соли могут быть получены *in situ* в процессе выделения и очистки соединений. В других вариантах осуществления соли могут быть приготовлены из свободной формы соединения на отдельной стадии синтеза.

Когда соединение формулы I обладает кислотными свойствами или содержит достаточное число биоизостерических заместителей, обладающих кислотными свойствами, подходящие "фармацевтически приемлемые соли" называют солями, полученными из фармацевтически приемлемым нетоксичных оснований, включающих неорганические основания и органические основания. Соли, образованные с неорганическими основаниями, включают соли алюминия, аммония, кальция, меди, железа(III), железа(II), лития, магния, марганца(III), марганца(II), калия, натрия, цинка и другие подобные соли. Конкретные варианты осуществления включают соли аммония, кальция, магния, калия и натрия. Соли, образованные фармацевтически приемлемыми органическими нетоксичными основаниями, включают соли первичных, вторичных и третичных аминов, замещенных аминов, в том числе природных замещенных аминов, циклических аминов и ионообменных смол с основными группами, таких как аргинин, бетаин, кофеин, холин, N,N'-дибензилэтилендиамин, диэтиламин, 2-диэтиламиноэтанол, 2-диметиламиноэтанол, этаноламин, этилендиамин, N-этилморфолин, N-этилпиперидин, глюкамин, глюкозамин, гистидин, гидрабамин, изопропиламин, лизин, метилглюкамин, морфолин, пиперазин, пиперидин, полиаминные смолы, прокаин, пурины, теобромин, триэтиламин, триметиламин трипропиламин, трометамин и другие подобные амины.

Когда соединение формулы I обладает основными свойствами или содержит достаточное число биоизостерических заместителей, обладающих основными свойствами, соли могут быть образованы из фармацевтически приемлемых нетоксичных кислот, включающих неорганические и органические кислоты. Такие кислоты включают уксусную, бензолсульфовую, бензойную, камфорсульфовую, лимонную, этансульфовую, фумаровую, глюконовую, глутаминовую, бромистоводородную, хлористоводородную, изэтиновую, молочную, малеиновую, яблочную, миндальную, метансульфовую, муциновую, азотную, памовую, пантотеновую, фосфорную, янтарную, серную, винную, п-толуолсульфовую кислоту и другие подобные кислоты. Конкретные варианты осуществления включают лимонную, бромистоводородную, хлористоводородную, малеиновую, фосфорную, серную и винную кислоты. Другие примеры солей включают, но этим не ограничивая, сульфатные, цитратные, ацетатные, оксалатные, хлоридные, бромидные, йодидные, нитратные, бисульфатные, фосфатные, кислые фосфатные, изоникотинатные, лактатные, салицилатные, кислые цитратные, тартратные, олеатные, таннатные, пантотенатные, битартратные, аскорбатные, сукцинатные, малеатные, гентизинатные, фумаратные, глюконатные, глюкоуронатные, сахаратные, формиатные, бензоатные, глутаматные, метансульфонатные, этансульфонатные, бензолсульфонатные, п-толуолсульфонатные и памоатные (то есть, 1,1'-метилен-би-(2-гидрокси-3-нафтоатные)) соли.

Приготовление описанных выше фармацевтически приемлемых солей и других типичных фармацевтически приемлемых солей более подробно описано в публикации Berg et al., "Pharmaceutical Salts," J. Pharm. Sci., 1977:66:1-19, полное содержание которой включено в настоящее изобретение путем ссылки на нее.

Помимо описанных в изобретении соединений их фармацевтически приемлемые соли могут быть также применяться в композициях для лечения или предотвращения указанных в изобретении заболеваний.

#### **Фармацевтические композиции и способы введения**

Описанные в изобретении соединения и их фармацевтически приемлемые соли могут быть приготовлены в форме фармацевтических композиций или в виде "лекарственных форм".

Типичную лекарственную форму приготавливают путем смешения соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли с носителем, разбавителем или вспомогательным веществом.

Специалистам в этой области хорошо известны подходящие носители, разбавители и вспомогательные вещества, и они включают такие материалы, как углеводы, воски, растворимые в воде и/или набухаемые в воде полимеры, гидрофильные или гидрофобные материалы, желатин, масла, растворители, воду и другие подобные материалы. Использование конкретного носителя, разбавителя или вспомогательного вещества будет зависеть от способов приготовления и цели, для которой приготавливают лекарственную форму соединения формулы I. Растворители обычно выбирают из растворителей, которые признаны специалистами в этой области в качестве безопасных (GRAS, то есть признаны безопасными) для введения млекопитающему. Как правило, безопасные растворители представляют собой нетоксичные водные растворители, такие как вода и другие нетоксичные растворители, которые растворимы в воде или смешиваются с водой. Подходящие водные растворители включают воду, этанол, пропиленгликоль, полиэтиленгликоли (например, PEG400, PEG300), другие подобные растворители и их смеси. Лекарственные формы могут также включать другие типы вспомогательных веществ, такие как один или несколько буферов, стабилизаторы, антиадгезивы, поверхностно-активные вещества, смачивающие средства, смазывающие средства, эмульгаторы, связующие, суспендирующие средства, разрыхлители, наполнители, сорбенты, покрытия (например, кишечнорастворимое покрытие или покрытие для замедленного высвобождения), консерванты, антиоксиданты, средства для нанесения непрозрачного покрытия, скользкие вещества, вспомогательное вещество, используемое в процессе производства, окрашивающие вещества, подсластители, ароматизирующие добавки, вкусовые добавки и другие известные добавки для получения привлекательного внешнего вида лекарственного средства (то есть, соединения

формулы I или его фармацевтической композиции) или для облегчения производства фармацевтического продукта (то есть, лекарственного препарата).

Лекарственные формы могут быть приготовлены, используя традиционные методы растворения и смешения. Например, порошкообразное сыпучее лекарственное вещество (то есть, соединение формулы I, его фармацевтически приемлемую соль или стабилизированную форму соединения, такую как комплекс с производным циклодекстрина или с другим известным комплексообразователем) растворяют в подходящем растворителе в присутствии одного или более описанных выше вспомогательных веществ. Соединение, имеющее требуемую степень чистоты, необязательно смешивают с фармацевтически приемлемыми разбавителями, носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами в форме лиофилизированной композиции, измельченного порошка или водного раствора. Лекарственная форма может быть получена смешением при температуре окружающей среды при соответствующей величине pH и при соответствующей степени чистоты с физиологически приемлемыми носителями. Величина pH лекарственной формы зависит главным образом от конкретного применения и концентрации соединения и может находиться в диапазоне от приблизительно 3 до приблизительно 8. В случае, когда описываемое в изобретении вспомогательное средство представляет собой твердую аморфную дисперсию, образовавшуюся в результате процесса растворения, добавки могут быть введены непосредственно в подвергаемый распылительной сушке раствор при образовании смеси, например, добавку растворяют или суспендируют в растворе в виде суспензии, которую затем подвергают распылительной сушке. В качестве варианта добавки могут быть введены после процесса распылительной сушки для облегчения образования конечной лекарственной формы.

Соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль обычно приготавливают в виде лекарственных форм, которые обеспечивают легкость регулирования дозы лекарственного средства и позволяют больному соблюдать предписанный режим и схему лечения. Лекарственные формы соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли могут быть приготовлены для различных способов и типов введения. Для одного и того же соединения могут существовать различные лекарственные формы, так как различные медицинские состояния могут требовать применение различных способов введения.

Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом носителя с получением лекарственной формы с разовой дозой, может зависеть от субъекта, подвергаемого лечению, и конкретного способа введения. Например, лекарственная форма с высвобождением лекарственного средства в течение времени, предназначенная для перорального введения людям, может содержать приблизительно от 1 до 1000 мг активного вещества, смешанного с соответствующим и подходящим количеством материала носителя, которое может изменяться от приблизительно 5 до приблизительно 95 масс.% от суммарной массы композиций.

Фармацевтическая композиция может быть приготовлена для легкого получения измеряемых количеств лекарственного средства для введения. Например, водный раствор, предназначенный для внутривенной инфузии, может содержать от приблизительно 3 до 500 мкг активного ингредиента на миллилитр раствора, для того чтобы можно было обеспечить инфузию подходящего объема со скоростью приблизительно 30 мл/час. В качестве общей нормы, начальное фармацевтически эффективное количество вводимого ингибитора может находиться в диапазоне 0,01-100 мг/кг на дозу, а именно, приблизительно от 0,1 до 20 мг/кг массы тела пациента в день, при этом используемый типичный начальный диапазон дозирования соединения составляет от 0,3 до 15 мг/кг/сутки.

Используемый в изобретении термин "терапевтически эффективное количество" обозначает такое количество активного соединения или фармацевтического вещества, при котором достигается биологический или лечебный ответ в ткани, системе, у животного или человека, которого добивается исследователь, ветеринар, лечащий врач или другой клинический врач. Терапевтически или фармацевтически эффективное количество вводимого соединения будет определяться приведенными выше соображениями, и оно является минимальным количеством, которое необходимо для облегчения, излечения или лечения заболевания или расстройства, или одного или более из его симптомов.

Фармацевтические композиции соединений формулы I должны быть приготовлены, дозированы и введены соответствующим образом, то есть количества, концентрации, схемы, курсы, носители и способы введения должны находиться в соответствии с требованиями надлежащей медицинской практики. Факторы, которые следует принимать во внимание в связи с этим, включают конкретное заболевание, подлежащее лечению, конкретное вскармливающее, подвергаемое лечению, клиническое состояние конкретного пациента, причину заболевания, место доставки лекарственного средства, способ введения, схему введения и другие факторы, известные лечащим врачам, например, возраст, масса тела и восприимчивость к лечению конкретного пациента.

Термин "профилактически эффективное количество" относится к количеству, которое является эффективным для предотвращения или существенного уменьшения вероятности возникновения заболевания или расстройства, или облегчения тяжести заболевания или расстройства до того, как оно возникло, или для облегчения тяжести одного или более из его симптомов до развития этих симптомов. В общих чертах профилактические меры подразделяют на первичную профилактику (для предотвращения воз-

никновения заболевания) и вторичную профилактику (когда заболевание уже находится в стадии развития, и пациента защищают от усугубления этого процесса развития заболевания).

Приемлемые разбавители, носители, вспомогательные вещества и стабилизаторы представляют собой вещества, которые являются нетоксичными для реципиентов в диапазоне используемых доз и концентраций, и включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид, гексаметония хлорид, бензалкония хлорид, бензетония хлорид, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехин, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как

поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие реагенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (PEG). Активные лекарственные ингредиенты могут быть также заключены в микрокапсулы, полученные, например, методами образования коацерватов или путем межфазной полимеризации, например, в гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и полиметилметакрилатные микрокапсулы, соответственно, в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, в липосомы, микросферы из альбумина, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методы описаны в монографии Remington's: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>st</sup> Edition, University of the Sciences in Philadelphia, Eds., 2005 (далее обозначаемой в тексте как "Remington's").

"Системы контролируемой доставки лекарственных средств" позволяет доставлять лекарственное средство в организм таким способом, который дает возможность точно контролировать соответствие количества вводимого лекарственного средства подвергаемому лечению состоянию. Основной целью является достижение терапевтической концентрации лекарственного средства в месте его действия в течение требуемого периода времени. Термин "контролируемое высвобождение" часто используется для обозначения различных методов, которые позволяют модифицировать высвобождение лекарственного средства из лекарственной формы. Этот термин включает препараты, обозначаемые как препараты "с пролонгированным высвобождением", "с замедленным высвобождением", "с модифицированным высвобождением" или "со стабильным высвобождением во времени". Как правило, можно обеспечить контролируемое высвобождение описанных в изобретении лекарственных средств путем использования большого разнообразия полимерных носителей и систем контролируемого высвобождения, включающих эродируемые и не эродируемые матрицы, осмотические регулирующие устройства, различные устройства в форме резервуаров, кишечнорастворимые оболочки и контролируемые устройства в форме множества частиц.

"Препараты со стабильным высвобождением во времени" являются наиболее распространенным применением метода контролируемого высвобождения. Подходящие примеры препаратов со стабильным высвобождением во времени включают содержащие соединение полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, причем матрицы представляют собой профилированные изделия, например, пленки или микрокапсулы. Примеры матриц со стабильным высвобождением во времени включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, полимер 2-гидроксиэтилметакрилата или поливиниловый спирт), полилактоиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата, небiorазлагаемые сополимеры этилена и винилацетата, биоразлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту.

Могут быть также приготовлены "препараты с быстрым высвобождением". Функцией этих лекарственных форм является осуществление, как можно быстрее, доставки лекарственного средства в кровоток и к месту его действия. Например, с целью быстрого растворения, большинство таблеток изготавливают таким образом, чтобы они при введении быстро распались на гранулы и затем дезагрегировались до высокодисперсных частиц. Это обеспечивает большую площадь поверхности, подвергающейся воздействию растворяющей среды, что приводит к увеличению скорости растворения.

Описанные в изобретении лекарственные средства могут быть включены в эродируемую или не эродируемую полимерную матрицу устройства для контролируемого высвобождения. Под эродируемой матрицей подразумевают эродируемые или набухающие в воде матрицы, или водорастворимые матрицы, в смысле их способности эродировать или набухать, или растворяться в чистой воде, или которые требуют присутствия кислоты или основания для их ионизации, достаточной для инициирования процесса эрозии или растворения. При контакте с водной средой, в которой применяется эродируемая полимерная матрица, она впитывает воду и образует набухший в воде гель или матрицу, которые содержат в себе описанное в изобретении лекарственное средство. Набухающая в воде матрица постепенно эродирует, увеличивается в размерах, распадается или растворяется в окружающей среде применения, в результате чего происходит контролируемое высвобождение описанного в изобретении соединения в окружающую среду применения. Один ингредиент этой набухающей в воде матрицы представляет собой способный к

набуханию, к эрозии или к растворению в воде полимер, который обычно называют осмотическим полимером, гидрогелем или набухающим в воде полимером. Такие полимеры могут представлять собой линейные, разветвленные или сшитые полимеры. Полимеры могут представлять собой гомополимеры или сополимеры. В конкретных вариантах осуществления, они могут представлять собой синтетические полимеры, полученными из мономеров винила, акрилата, метакрилата, уретана, сложного эфира и оксидов. В других вариантах осуществления, они могут быть производными природных полимеров, таких как полисахариды (например, хитин, хитозан, декстран и пуллулан, камедь агар, гуммиарабик, камедь карайи, камедь бобов рожкового дерева, камедь трагакант, каррагенан, камедь гатти, гуаровая камедь, ксантановая камедь и склероглюкан), крахмалы (например, декстрин и мальтодекстрин), гидрофильные коллоиды (например, пектин), фосфатиды (например, лецитин), альгинаты (например, альгинат аммония, альгинат натрия, калия или кальция, альгинат пропиленгликоля), желатин, коллаген и целлюлозные полимеры. Целлюлозные полимеры представляют собой полимер целлюлозы, который был модифицирован путем взаимодействия, по меньшей мере, части гидроксильных групп на сахаридных повторяющихся звеньях с соединением с образованием сложноэфирной связи или связанного через простой эфир заместителя. Так, например, полимер этилцеллюлозы имеет связанный через эфир этильный заместитель, присоединенный к сахаридному повторяющемуся звену, а полимер ацетата целлюлозы имеет связанный через сложный эфир ацетатный заместитель. В конкретных вариантах осуществления, целлюлозные полимеры для эродируемой матрицы включают растворимые в воде и эродируемые в воде целлюлозы, которые могут включать, например, этилцеллюлозу (ЕС), метилэтилцеллюлозу (МЕС), карбоксиметилцеллюлозу (СМС), карбоксиметилэтилцеллюлозу (СМЕС), гидроксиэтилцеллюлозу (НЕС), гидроксипропилцеллюлозу (НРС), ацетат целлюлозы (СА), пропионат целлюлозы (СР), бутират целлюлозы (СВ), ацетат бутират целлюлозы (САВ), САР, САТ, гидроксипропилметилцеллюлозу (НРМС), НРМСР, НРМСАС, ацетаттримеллитат гидроксипропилметилцеллюлозы (НРМСАТ) и этилгидроксиэтилцеллюлозу (ЕНЕС). В конкретных вариантах осуществления, целлюлозные полимеры включают различные сорта гидроксипропилметилцеллюлозы (НРМС) с низкой вязкостью (молекулярная масса меньше или равна 50000 дальтон, например, Dow Methocel™ серии E5, E15LV, E50LV и K100LY) и с высокой вязкостью (молекулярная масса больше 50000 дальтон, например, E4MCR, E10MCR, K4M, и K15M K100M и Methocel™ серии K). Другие коммерчески доступные типы гидроксипропилметилцеллюлозы (НРМС) включают Shin Etsu Metolose серии 90SH.

Другие вещества, используемые в качестве эродируемого материала матрицы, включают, но этим не ограничивая, пуллулан, поливинилпирролидон, поливиниловый спирт, поливинилацетат, эфиры глицерина и жирных кислот, полиакриламид, полиакриловую кислоту, сополимеры этакриловой кислоты или метакриловой кислоты (EUDRAGIT®, Rohm America, Inc., Piscataway, New Jersey) и другие производные акриловой кислоты, такие как гомополимеры и сополимеры бутилметакрилата, метилметакрилата, этилметакрилата, этилакрилата, (2-диметиламиноэтил)метакрилата и хлорида (триметиламиноэтил)метакрилата.

В качестве варианта, лекарственные средства по настоящему изобретению могут быть введены или включены в устройства на основе неэродируемых матриц. В таких устройствах описанное в изобретении лекарственное средство распределено в инертной матрице. Лекарственное средство высвобождается в результате диффузии через инертную матрицу. Примеры материалов, подходящих для инертной матрицы, включают нерастворимые пластмассы (например, сополимеры метилакрилат-метилметакрилат, поливинилхлорид, полиэтилен), гидрофильные полимеры (например, этилцеллюлоза, ацетат целлюлозы, сшитый поливинилпирролидон (известный также, как кросповидон)) и алифатические соединения жирного ряда (например, карнаубский воск, микрокристаллический воск и триглицериды). Такие устройства подробно описаны в монографии Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition (2000).

Как отмечалось выше, описанные в изобретении лекарственные средства могут быть также включены в осмотическое устройство для контролируемого высвобождения. Такие устройства обычно включают сердцевину, содержащую одно или более описанных в изобретении лекарственных средств, и окружающую сердцевину водонепроницаемую, водонерастворимую и неэродируемую оболочку, которая регулирует поступление воды в сердцевину из окружающей водной среды, в которой применяется эта лекарственная форма, применения таким образом, в силу чего происходит высвобождение лекарственного средства в результате вытеснения некоторого количества или всего количества содержимого из сердцевины в окружающую среду, в которой применяется лекарственная форма. В конкретных вариантах осуществления оболочка является полимерной, водонепроницаемой и имеет по меньшей мере одно нагнетательное отверстие. Сердцевина осмотического устройства необязательно включает осмотический реагент, функцией которого является всасывание воды из окружающей среды через такую полупроницаемую мембрану. Осмотический реагент, содержащийся в сердцевине этого устройства, может представлять собой способный к набуханию в воде гидрофильный полимер или он может представлять собой осмоген, также известный как осмореагент. Внутри устройства создается давление, которое заставляет лекарственное средство (средства) выделяться из устройства через отверстие (размер которого должен быть выбран так, чтобы свести к минимуму диффузию растворенного вещества, предотвращая при этом



увеличение гидростатического напора). Неограничивающие примеры осмотических устройств для контролируемого высвобождения лекарственного препарата описаны в патентном документе U.S. Patent Application Serial No. 09/495061.

Количество способного к набуханию в воде гидрофильного полимера, присутствующего в сердцевине, может находиться в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 80 мас.% (в том числе, например, от 10 до 50 мас.%). Неограничивающие примеры материалов сердцевины включают гидрофильные виниловые и акриловые полимеры, полисахариды, такие как альгинат кальция, полиэтиленоксид (PEO), полиэтиленгликоль (PEG), полипропиленгликоль (PPG), полимер 2-гидроксиэтилметакрилата, полиакриловую кислоту, полиметакриловую кислоту, поливинилпирролидон (PVP) и сшитый PVP, поливиниловый спирт (PVA), сополимеры PVA/PVP и сополимеры PVA/PVP с гидрофобными мономерами, такими как метилметакрилат, винилацетат и другие подобные гидрофобные мономеры, гидрофильные полиуретаны, содержащие большие блоки PEO, кроскармеллозу натрия, каррагенан, гидроксипропилцеллюлозу (HPC), гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC), карбоксиметилцеллюлозу (CMC) и карбоксиэтилцеллюлозу (CEC), альгинат натрия, поликарбофил, желатин, ксантановую камедь и натрия крахмалгликолят. Другие материалы включают гидрогели, содержащие взаимопроникающие сетки полимеров, которые могут быть образованы в результате проведения аддитивной полимеризации или конденсационной полимеризации, компоненты которых могут включать такие гидрофильные и гидрофобные мономеры, как указано выше. Способные к набуханию в воде гидрофильные полимеры включают, но этим не ограничивая, PEO, PEG, PVP, кроскармеллозу натрия, HPMC, натрия крахмалгликолят, полиакриловую кислоту и их поперечно-сшитые варианты или их смеси.

Сердцевина может также включать осмоген (или осмотический реагент). Количество осмогена, присутствующего в сердцевине, может находиться в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 70 мас.% (в том числе, например, от 10 до 50 мас.%). Типичными представителями подходящих осмогенов являются водорастворимые органические кислоты, соли и сахара, которые способны впитывать воду, в результате чего возникает градиент осмотического давления на границе окружающей сердцевину оболочки. Типичные примеры применяемых осмогенов включают, но этим не ограничивая, сульфат магния, хлорид магния, хлорид кальция, хлорид натрия, хлорид лития, сульфат калия, карбонат натрия, сульфит натрия, сульфат лития, хлорид калия, сульфат натрия, маннит, ксилит, мочевины, сорбит, инозит, раффинозу, сахарозу, глюкозу, фруктозу, лактозу, лимонную кислоту, янтарную кислоту, винную кислоту и их смеси. В конкретных вариантах осуществления осмогеном является глюкоза, лактоза, сахароза, маннит, ксилит, хлорид натрия и в том числе их комбинации.

Скорость доставки лекарственного средства контролируется такими факторами, как проницаемость и толщина оболочки, осмотическое давление содержащего лекарственное средство слоя, степень гидрофильности слоя гидрогеля и площадь поверхности устройства. Для специалистов в данной области является очевидным, что увеличение толщины оболочки будет уменьшать скорость высвобождения, в то время как любой из указанных далее факторов будет способствовать увеличению скорости высвобождения: повышение проницаемости оболочки, увеличение гидрофильности слоя гидрогеля, повышение осмотического давления содержащего лекарственное средство слоя или увеличение площади поверхности устройства.

В конкретных вариантах осуществления является желательным унос частиц описанных в изобретении лекарственных средств вытесняемой жидкостью в процессе работы такого осмотического устройства. В случае частиц, которые хорошо уносятся вытесняемой жидкостью, форму лекарственного средства диспергируют в жидкости перед осаждением частиц в сердцевине таблетки. Одним из способов осуществления этого является добавление разрыхлителя, который предназначен для разрушения спрессованной сердцевины на частицы составляющих ее компонентов. Неограничивающие примеры стандартных разрыхлителей включают такие вещества, как натрия крахмалгликолят (например, Explotab™ CLV), микрокристаллическая целлюлоза (например, Avicel™), микрокристаллическая окремненная целлюлоза (например, ProSolv™) и кроскармеллоза натрия (например, Ac-Di-Sol™), а также другие известные специалистам в этой области разрыхлители. В зависимости от конкретной лекарственной формы, некоторые разрыхлители работают лучше, чем другие. Некоторые разрыхлители склонны образовывать гели, так как они набухают в воде, что затрудняет высвобождение лекарственного средства из устройства. Негелеобразующие ненабухающие разрыхлители обеспечивают более быстрое диспергирование частиц лекарственного средства в сердцевине по мере поступления воды в сердцевину. В конкретных вариантах осуществления, негелеобразующие ненабухающие разрыхлители представляют собой смолы, например, ионообменные смолы. В одном варианте осуществления, используют смолу Amberlite™ IRP 88 (фирмы Rohm and Haas, Philadelphia, PA). В случае использования разрыхлителя он присутствует в количествах приблизительно 1-25% от количества лекарственного средства в сердцевине.

Другим примером осмотического устройства является осмотическая капсула. Оболочка капсулы или часть оболочки капсулы может быть полупроницаемой. Капсула может быть заполнена либо порошком, либо жидкостью, состоящими из описанного в изобретении лекарственного средства, вспомогательных веществ, которые впитывают воду, для создания осмотического потенциала, и/или набухающего в

воде полимера или, необязательно, солюбилизующих вспомогательных веществ. Сердцевина капсулы также может быть изготовлена таким образом, что она будет иметь два слоя или много слоев лекарственного средства, аналогично описанным выше двухслойным, трехслойным или концентрическим композициям.

Другой представитель осмотического устройства, используемого в этом изобретении, включает набухающие таблетки в оболочке, например, описанные в патентном документе EP 378404. Набухающие таблетки в оболочке включают сердцевину, содержащую описанное в изобретении лекарственное средство и набухающий материал, предпочтительно, гидрофильный полимер, с нанесенной на него мембраной, содержащей отверстия или поры, через которые в водной среде гидрофильный полимер может вытеснять и доставлять лекарственное средство. В качестве варианта, мембрана может содержать полимерные или низкомолекулярные водорастворимые порообразователи. Порообразователи растворяются в окружающей водной среде, в которой используют лекарственную форму, образуя поры, через которые могут вытесняться гидрофильный полимер и лекарственное средство. Примерами порообразователей являются водорастворимые полимеры, такие как НРМС, PEG, и низкомолекулярные соединения, такие как глицерин, сахароза, глюкоза и хлорид натрия. Кроме того, поры могут быть образованы в оболочке путем сверления отверстий в оболочке с помощью лазера или другими механическими способами. В этом типе осмотических устройств материал мембраны может включать любой пленкообразующий полимер, в том числе полимеры, которые являются водонепроницаемыми или водонепроницаемыми, при условии, что мембрана, нанесенная на сердцевину таблетки, является пористой или содержит водорастворимые порообразователи, или имеет макроскопическое отверстие для доступа воды и высвобождения лекарственного средства. Варианты осуществления этого типа устройств со стабильным высвобождением во времени также могут включать многослойные устройства, описанные, например, в патентном документе EP 378404.

Когда описанное в изобретении лекарственное средство является жидкостью или маслом, например, как в случае лекарственной формы с липидным носителем, описанной, например, в патентном документе WO 05/011634, устройство для осмотического контролируемого высвобождения может содержать мягкие желатиновые или желатиновые капсулы, имеющие композитные стенки, включающие жидкую композицию, при этом стенка содержит граничный слой, образованный на внешней поверхности капсулы, расширяющийся слой, образованный поверх граничного слоя, и полупроницаемый слой, образованный на расширяющемся слое. Нагнетательное отверстие соединяет жидкую композицию с окружающей водной средой, в которой применяется данное устройство. Такие устройства описаны, например, в патентных документах US 6419952, US 6342249, US 5324280, US 4672850, US 4627850, US 4203440 и US 3995631.

Как уже было указано выше, описанные в изобретении лекарственные средства могут быть приготовлены в виде микрочастиц, обычно имеющих размер в диапазоне от приблизительно 10 мкм до приблизительно 2 мм (в том числе, например, от приблизительно 100 мкм до 1 мм в диаметре). Это множество микрочастиц может быть расфасовано, например, в капсулу, такую как желатиновая капсула, или капсулу, образованную из растворимого в воде полимера, такого как НРМС, НРМС или крахмал, дозированы в виде суспензии или эмульсии в жидкости, или они могут быть сформированы в таблетку, драже или пилюлю методом прессования или другими методами, известными в данной области. Это множество микрочастиц может быть получено любым известным способом, таким как мокрое и сухое гранулирование, экструзия/окатывание, вальцевание, отверждение из расплава, или путем нанесения распылением затравок кристаллов оболочки.

Например, при использовании процессов мокрой и сухой грануляции, описанное в изобретении лекарственное средство и, необязательно, вспомогательные вещества могут быть гранулированы с образованием множества микрочастиц требуемого размера.

Лекарственные средства могут быть включены в микроэмульсии, которые обычно являются термодинамически стабильными, изотропно чистыми дисперсиями двух несмешивающихся жидкостей, таких как масло и вода, стабилизированными межфазной пленкой из молекул поверхностно-активного вещества (Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, New York: Marcel Dekker, 1992, volume 9). Для приготовления микроэмульсий необходимы поверхностно-активное вещество (эмульгатор), дополнительное поверхностно-активное вещество (вспомогательный эмульгатор), масляная фаза и водная фаза. Подходящие поверхностно-активные вещества включают любые поверхностно-активные вещества, которые могут применяться при изготовлении эмульсий, например, эмульгаторы, которые обычно используют при изготовлении кремов. Дополнительное поверхностно-активное вещество (или "дополнительный эмульгатор") обычно выбирают из группы производных полиглицерина, производных глицерина и жирных спиртов. Предпочтительные комбинации эмульгатор/дополнительный эмульгатор, как правило, но необязательно, выбирают из группы, состоящей из моностеарата глицерина и полиоксиэтиленстеарата, полиэтиленгликоля и пальмитолеата этиленгликоля; и триглицеридов каприловой и каприновой кислот и макроглицеридов олеиновой кислоты. Водная фаза включает не только воду, но и, обычно, буферы, глюкозу, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, предпочтительно низкомолекулярные полиэтиленгликоли (например, PEG 300 и PEG 400), и/или глицерин, и другие подобные вещества, в то время как масля-

ная фаза обычно содержит, например, сложные эфиры жирных кислот, модифицированные растительные масла, силиконовые масла, смеси моно-, ди- и триглицеридов, сложные моно- и диэфиры PEG (например, глицериды олеилмакрогола) и другие подобные вещества.

Описанные в изобретении соединения могут быть включены в фармацевтически приемлемые композиции наночастиц, наносфер и наночапул (Delie and Blanco-Prieto, 2005, Molecule 10:65-80). Наночапулы, как правило, могут захватывать соединения стабильным и воспроизводимым образом. Для предотвращения побочных эффектов, обусловленных внутриклеточной перегрузкой полимерными веществами, могут быть разработаны ультрадисперсные частицы (размером примерно 0,1 мкм) с использованием полимеров, способных разлагаться *in vivo* (например, биоразлагаемые полиалкилцианоакрилатные наночастицы). Такие частицы описаны в предшествующих патентных документах.

Имплантируемые устройства с нанесенным на них слоем соединения по настоящему изобретению являются еще одним вариантом осуществления настоящего изобретения. Соединения также могут быть нанесены на имплантируемые медицинские устройства, такие как сферы, или совместно приготовлены с полимером или другой молекулой с целью получения "депо-препарата", который обеспечивает высвобождение лекарственного средства в течение более длительного периода времени, чем в случае введения водного раствора лекарственного средства. Подходящие покрытия и общие способы получения имплантируемых устройств с нанесенным на них слоем лекарственного средства описаны в патентных документах US 6099562, 5886026 и 5304121. Покрытия обычно представляют собой биосовместимые полимерные вещества, такие как полимерный гидрогель, полиметилдисилоксан, поликапролактон, полиэтиленгликоль, полимолочная кислота, этиленвинилацетат и их смеси. На покрытие может быть необязательно дополнительно нанесен подходящий верхний слой фторсиликона, полисахаридов, полиэтиленгликоля, фосфолипидов или их комбинаций для придания композиции способности контролировать высвобождение лекарственного средства.

Лекарственные формы включают такие лекарственные формы, которые подходят для применения в описанных в изобретении способах введения. Лекарственные формы удобно приготавливать в виде лекарственной формы с разовой дозой, и их можно изготовить любым из хорошо известных в фармацевтике методов. Методы и лекарственные формы в целом описаны в монографии Remington's. Такие методы включают стадию смешения активного ингредиента с носителем, который состоит из одного или более вспомогательных ингредиентов. Как правило, лекарственные формы получают путем равномерного и тщательного смешивания активного ингредиента с жидкими носителями или тонко измельченными твердыми носителями, или с теми и другими, а затем, в случае необходимости, профилирования продукта.

Термины "вводить" или "введение" в отношении соединения, композиции или лекарственной формы по изобретению означают введение соединения в организм животного, нуждающегося в лечении. Когда соединение по изобретению применяют в комбинации с одним или более другими активными средствами, то подразумевается, что термин "введение" и его варианты включают одновременное и/или последовательное введение соединения и других активных средств.

Описанные в изобретении композиции могут быть введены системно или местно, например, перорально (например, в форме капсул, порошков, растворов, суспензий, таблеток, сублингвальных таблеток и других подобных лекарственных форм), ингаляционно (например, в форме аэрозоля, газа, с помощью ингалятора, небулайзера или другим подобным образом), в ухо (например, в форме ушных капель), местно (например, в форме кремов, гелей, линиментов, лосьонов, мазей, паст, пластырей и других подобных лекарственных форм), офтальмологически (например, в форме глазных капель, глазных гелей, глазных мазей), ректально (например, с помощью клизмы или в форме суппозитория), назально, буккально, вагинально (например, используя спринцевание, внутриматочные устройства, вагинальные суппозитории, вагинальные кольца или таблетки и другие подобные формы), с помощью имплантированного резервуара или других подобных устройств, или парентерально, в зависимости от степени тяжести и типа заболевания, подвергаемого лечению. Используемый в изобретении термин "парентеральный" включает, но этим не ограничивая, подкожную, внутривенную, внутримышечную, внутрисуставную, интрасиновиальную, интрастернальную, интратекальную, внутривенную, внутрипеченочную, внутриочаговую и интракраниальную инъекцию или инфузию. Предпочтительно вводить композиции перорально, внутрибрюшинно или внутривенно.

Описанные в изобретении фармацевтические композиции могут быть введены перорально в любой перорально приемлемой лекарственной форме, включающей, но этим не ограничивая, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. Жидкие лекарственные формы для перорального введения включают, но этим не ограничивая, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Помимо активных соединений жидкие лекарственные формы могут содержать обычно используемые в фармацевтике инертные разбавители, такие как, например, вода или другие растворители, солюбилизаторы и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное масла, масло из проросших зерен пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, поли-

этиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана и их смеси. Помимо инертных разбавителей, пероральные композиции могут также содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие вещества, эмульгаторы и суспендирующие вещества, подсластители, вкусовые и ароматизирующие вещества.

Твердые лекарственные формы для перорального введения включают капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых лекарственных формах, активное соединение смешивают, по меньшей мере, с одним инертным фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом или носителем, таким как цитрат натрия или дикальцийфосфат, и/или а) наполнителями или разбавителями, такими как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота, б) связующими, такими как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидинон, сахароза и аравийская камедь, в) увлажнителями, такими как глицерин, д) разрыхлителями, такими как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или кукурузный крахмал, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия, е) реагентами, замедляющими растворение, такими как парафин, ф) ускорителями всасывания, такими как четвертичные аммониевые соединения, г) смачивающими веществами, такими как, например, цетиловый спирт и моностеарат глицерина, h) абсорбентами, такими как каолин и бентонитовая глина, и i) скользящими веществами, такими как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси. Таблетки могут не иметь покрытия или могут иметь покрытие, нанесенное известными способами, включая микрокапсулирование, для того чтобы замаскировать неприятный вкус или замедлить распад и всасывание в желудочно-кишечном тракте, обеспечивая тем самым стабильное действие в течение более длительного периода. Например, может быть использован материал для задержки по времени, такой как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат, сам по себе или вместе с воском. Могут быть использованы водорастворимые вещества, маскирующие вкус, такие как гидроксипропилметилцеллюлоза или гидроксипропилцеллюлоза.

Лекарственные формы соединения формулы I, которые применяются для перорального введения, могут быть приготовлены в виде дискретных единиц, таких как таблетки, драже, пастилки, леденцы, водные или масляные суспензии, диспергируемые порошки или гранулы, эмульсии, твердые или мягкие капсулы, например желатиновые капсулы, сиропы или эликсиры. Лекарственные формы соединения, предназначенные для перорального применения, могут быть приготовлены любым известным методом получения фармацевтических композиций.

Прессованные таблетки могут быть изготовлены путем прессования на соответствующей установке активного ингредиента в сыпучей форме, такой как порошок или гранулы, необязательно смешанного со связующим, скользящим веществом, инертным разбавителем, консервантом, поверхностно-активным или диспергирующим веществом. Формованные таблетки могут быть изготовлены формованием на соответствующей установке смеси порошкообразного активного ингредиента, увлажненного инертным жидким разбавителем.

Лекарственные формы для перорального применения могут быть также представлены твердыми желатиновыми капсулами, в которых активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем, например, карбонатом кальция, фосфатом кальция или каолином, или мягкими желатиновыми капсулами, в которых активный ингредиент смешан с водорастворимым носителем, таким как полиэтиленгликоль, или с масляной средой, например, арахисовым маслом, жидким парафином или оливковым маслом.

Активные соединения могут также находиться в микрокапсулированной форме вместе с одним или более указанными выше вспомогательными веществами.

Когда для перорального применения требуется приготовить водные суспензии, активный ингредиент смешивают с эмульгаторами и суспендирующими средствами. При необходимости, могут быть добавлены конкретные подсластители и/или ароматизаторы. Сиропы и эликсиры могут быть приготовлены с подсластителями, например, с глицерином, пропиленгликолем, сорбитом или сахарозой. Такие лекарственные формы могут также содержать средство, уменьшающее раздражение, консервант, вещество, корригирующее вкус и запах, краситель и антиоксидант.

Стерильные инъекционные формы описанных в изобретении композиций (например, для парентерального введения), могут представлять собой водную или масляную суспензию. Эти суспензии могут быть приготовлены известными в данной области методами с использованием подходящих диспергирующих или смачивающих средств и суспендирующих средств. Стерильный инъекционный препарат может также представлять собой стерильный инъекционный раствор или суспензию в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, такой как раствор в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых носителей и растворителей, которые можно использовать, следует упомянуть воду, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды обычно используют стерильные нелетучие масла. Для этой цели может быть использовано любое мягкое нелетучее масло, в том числе синтетические моно- или диглицериды. При приготовлении инъекционных препаратов могут применяться жирные кислоты, такие как олеиновая кислота и ее глицеридные производные, а также фармацевтически приемлемые природные масла, такие как оливковое масло или касторовое масло, в частности их полиоксипропилированные модификации. Эти масляные растворы или суспензии могут также содержать разбавитель или диспергирующее средство на

основе длинноцепочечного спирта, такого как карбоксиметилцеллюлоза, или аналогичные диспергирующие средства, которые обычно используют в составе фармацевтически приемлемых лекарственных форм, включающих эмульсии и суспензии. В инъекируемых препаратах могут также применяться другие широко используемые поверхностно-активные вещества, такие как Tweens, Spans, и другие эмульгаторы или вещества, повышающие биодоступность, которые обычно применяют при изготовлении фармацевтически приемлемых твердых, жидких или других лекарственных форм.

Масляные суспензии могут быть приготовлены путем суспендирования соединения формулы I в растительном масле, например арахисовом масле, оливковом масле, кунжутном масле или кокосовом масле, или в минеральном масле, таком как жидкий парафин. Масляные суспензии могут содержать загуститель, например, пчелиный воск, твердый парафин или цетиловый спирт. С целью придания пероральному препарату соответствующего вкуса, могут быть добавлены подсластители, такие как указанные выше, и ароматизаторы. Для обеспечения длительного хранения этих композиций в них добавляют антиоксидант, такой как бутилированный гидроксианизол или альфа-токоферол.

Водные суспензии соединения формулы I содержат активные вещества в смеси с вспомогательными веществами, подходящими для использования при изготовлении водных суспензий. Такие вспомогательные вещества включают суспендирующее средство, такое как натрия карбоксиметилцеллюлоза, кроскармеллоза, повидон, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовая камедь и аравийская камедь, и диспергирующие или смачивающие средства, такие как природный фосфатид (например, лецитин), продукт конденсации алкиленоксида с жирной кислотой (например, полиоксиэтиленстеарат), продукт конденсации этиленоксида с длинноцепочечным алифатическим спиртом (например, гептадекаэтиленоксидетанол), продукт конденсации этиленоксида с неполным сложным эфиром жирной кислоты и гекситолового ангидрида (например, полиоксиэтиленсорбитан моноолеат). Водная суспензия может также содержать один или более консервантов, таких как этил- или n-пропил-p-гидроксibenзоат, один или более красителей, один или более ароматизаторов и один или более подсластителей, таких как сахароза или сахарин.

Инъекируемые лекарственные формы могут быть стерилизованы, например, путем фильтрации через удерживающий бактерии фильтр или путем введения стерилизующих веществ в форме стерильных твердых композиций, которые могут быть растворены или диспергированы в стерильной воде или другой стерильной инъекируемой среде перед применением.

Для того чтобы пролонгировать действие описанного в изобретении соединения, часто является желательным замедление всасывание из места подкожной или внутримышечной инъекции. Это может быть достигнуто путем использования жидкой суспензии кристаллического или аморфного вещества с низкой растворимостью в воде. В этом случае скорость всасывания соединения зависит от скорости его растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристаллов и кристаллической формы. В качестве варианта, замедленное всасывание парентерально вводимой лекарственной формы соединения достигается путем растворения или суспендирования соединения в масляном носителе. Инъекируемые депо-формы изготавливают путем формирования микроинкапсулированных матриц соединения в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. Выбирая соотношение соединения и полимера и свойства конкретно используемого полимера, можно контролировать скорость высвобождения соединения. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают полиортоэфир и полиангидриды. Инъекируемые депо-формы также получают путем включения соединения в липосомы или микроэмульсии, которые совместимы с тканями организма.

Инъекируемые растворы или микроэмульсии могут быть введены в кровоток пациента путем местной болюсной инъекции. В качестве варианта, более эффективным может быть введение раствора или микроэмульсии таким образом, чтобы поддерживать постоянную циркулирующую концентрацию быстро растворимого соединения. Для того чтобы поддерживать такую постоянную концентрацию, могут быть использованы устройства непрерывной внутривенной доставки. Примером такого устройства является устройство для внутривенного струйного введения Deltac CADD-PLUS™ model 5400.

Предпочтительными композициями для ректального или вагинального введения являются суппозитории, которые могут быть получены путем смешения описанных в изобретении соединений с подходящими не вызывающими раздражения вспомогательными веществами или носителями, такими как масло какао, пчелиный воск, полиэтиленгликоль или воск для суппозитория, которые являются твердыми при температуре окружающей среды, но жидкими при температуре тела и, следовательно, расплавляются в ректальной или вагинальной полости и высвобождают активное соединение. Другие лекарственные формы, применяемые для вагинального введения, могут представлять собой pessaries, тампоны, кремы, гели, пасты, пены или спреи.

Описанные в изобретении фармацевтические композиции могут быть также введены местно, в частности, когда целенаправленно подвергаются лечению области или органы, легко доступные для местного введения, включая заболевания глаза, уха, кожи или нижнего отдела кишечника. Подходящие лекарственные формы для местного введения могут быть легко приготовлены для каждой из этих областей или органов.

Лекарственные формы для местного или трансдермального введения описанного в изобретении со-

единения включают мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, порошки, растворы, спреи, ингаляторы или пластыри. Активный компонент смешивают в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и в зависимости от обстоятельств с любыми необходимыми консервантами или буферами. Предполагается, что офтальмологическая лекарственная форма, ушные капли и глазные капли также входят в объем настоящего изобретения. Кроме того, настоящее изобретение предусматривает применение трансдермальных пластырей, которые имеют дополнительное преимущество, обусловленное их способностью обеспечивать контролируемую доставку соединения в организм. Такие лекарственные формы могут быть приготовлены путем растворения или диспергирования соединения в соответствующей среде. Для интенсификации прохождения соединения через кожу могут быть также использованы вещества, усиливающие всасывание. Скорость может контролироваться либо путем использования регулирующей скорости мембраны, либо путем диспергирования соединения в полимерной матрице или геле. Местное введение в случае нижних отделов кишечного тракта может быть осуществлено путем использования ректальных суппозиториях (описанных выше) или подходящей лекарственной формы в виде клизмы. Могут быть также использованы трансдермальные пластыри для местного применения.

Фармацевтические композиции для местного применения могут быть приготовлены в виде подходящей мази, содержащей активный компонент, суспендированный или растворенный в одном или нескольких носителях. Носители для местного введения соединений по настоящему изобретению включают, но этим не ограничивая, минеральное масло, жидкий вазелин, белый вазелин, пропиленгликоль, полиоксиэтилен, полиоксипропилен, эмульгирующий воск и воду. В качестве варианта, фармацевтические композиции могут быть приготовлены в виде подходящего лосьона или крема, содержащего активные компоненты, суспендированные или растворенные в одном или нескольких фармацевтически приемлемых носителях. Подходящие носители включают, но этим не ограничивая, минеральное масло, сорбитанмоностеарат, полисорбат 60, воск из цетиловых эфиров, цетеариловый спирт, 2-октилдодеканол, бензиловый спирт и воду.

Фармацевтические композиции для офтальмологического применения могут быть приготовлены в виде микронизированных суспензий в изотоническом стерильном физиологическом растворе со скорректированной величиной pH или, предпочтительно, в виде растворов в изотоническом стерильном физиологическом растворе со скорректированной величиной pH, в присутствии или в отсутствие консерванта, такого как бензалкония хлорид. В качестве варианта, фармацевтические композиции для офтальмологического применения могут быть приготовлены в виде мази, такой как вазелин. Для лечения глаз или других наружных тканей, например, рта и кожи, лекарственные формы могут быть нанесены в виде мази или крема для местного применения, содержащих активный ингредиент (ингредиенты) в количестве, например, от 0,075 до 20 мас.%. В случае изготовления в форме мази, активные ингредиенты могут быть использованы с любой мазевой основой из масляной мазевой основы, парафиновой мазевой основы или смешивающейся с водой мазевой основы.

В качестве варианта активные ингредиенты могут быть приготовлены в виде крема с кремовой основой типа масло-в-воде. В случае необходимости водная фаза кремовой основы может включать многоатомный спирт, то есть спирт, имеющий две или более гидроксильных групп, такой как пропиленгликоль, бутан-1,3-диол, маннит, сорбит, глицерин и полиэтиленгликоль (включая PEG 400) и их смеси. Лекарственные формы для местного применения могут, если это целесообразно, включать соединение, которое усиливает всасывание или проникновение активного ингредиента через кожу или другие пораженные участки. Примеры таких веществ, усиливающих проникновения через кожу, включают диметилсульфоксид и его аналоги.

Масляная фаза эмульсий, приготовленных с использованием соединения формулы I, может быть образована из известных ингредиентов любым известным методом. Несмотря на то, что фаза может содержать только эмульгатор (называемый иначе эмульгентом), тем не менее, желательно, чтобы фаза содержала смесь, по меньшей мере, одного эмульгатора с жиром или маслом, или и с жиром, и с маслом. Гидрофильный эмульгатор может быть введен вместе с липофильным эмульгатором, который действует в качестве стабилизатора. В некоторых вариантах осуществления, эмульгатор включает как масло, так и жир. При совместном присутствии, эмульгатор (эмульгаторы) вместе или без стабилизатора (стабилизаторов) образует (образуют) так называемый эмульгирующий воск, а воск вместе с маслом и жиром образуют так называемую эмульгирующую основу мази, которая формирует масляную дисперсную фазу кремовых лекарственных форм. Эмульгенты и стабилизаторы эмульсии, пригодные для использования в лекарственной форме соединения формулы I, включают Tween™-60, Span™-80, цетостеариловый спирт, бензиловый спирт, миристиловый спирт, глицерилмоностеарат и лаурилсульфат натрия.

Фармацевтические композиции могут быть также введены в форме назального аэрозоля или путем ингаляции. Такие композиции приготавливают хорошо известными в фармацевтике методами, и они могут быть приготовлены в виде растворов в физиологическом растворе с использованием бензилового спирта или других подходящих консервантов, промоторов всасывания для повышения биодоступности, фторуглеродов и/или других традиционных солюбилизующих или диспергирующих средств. Лекарственные формы, применяемые для внутрилегочного или назального введения, имеют размер частиц, например, в диапазоне от 0,1 до 500 мкм (включая частицы с размерами в диапазоне от 0,1 до 500 мкм с

шагом увеличения размера на 0,5, 1, 30, 35 мкм и т.д.), и эти частицы вводят путем быстрой ингаляции через носовой ход или путем ингаляции через рот для достижения ими альвеолярных мешочков.

В зависимости от способа, применяемого для введения лекарственного средства, фармацевтическая композиция (или лекарственная форма) может быть расфасована различными методами. Как правило, поставляемое для продажи изделие включает контейнер, содержащий вложенную в него фармацевтическую композицию в соответствующей лекарственной форме. Подходящие для этой цели контейнеры хорошо известны специалистам в данной области, и они включают такие контейнеры, как бутылки (пластиковые и стеклянные), пакетики, ампулы, пластиковые мешки, металлические цилиндры и другие подобные контейнеры. Контейнер может также включать приспособление, исключающее случайной доступ к содержимому упаковки. Кроме того, на контейнере присутствует нанесенная на него этикетка, на которой описано содержимое контейнера. На этикетке могут быть также приведены соответствующие предостережения.

Лекарственные формы могут быть расфасованы в контейнеры с разовой или многократной дозой, например, в герметические ампулы и флаконы, и могут храниться в сублимированном (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекций, непосредственно перед применением. Приготовленные для немедленной инъекции растворы и суспензии приготавливают из стерильных порошков, гранул и таблеток, описанного выше типа. Предпочтительными лекарственными формами с разовой дозой являются лекарственные формы, содержащие суточную дозу активного ингредиента или его разовую суточную дозу, описанную выше, или соответствующую ее часть.

В еще одном аспекте, соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль могут быть приготовлены в форме ветеринарной композиции, содержащей ветеринарный носитель. Ветеринарными носителями являются вещества, используемые для введения композиции, и они могут быть твердыми, жидкими или газообразными веществами, которые являются также инертными, приемлемыми с точки зрения ветеринарии и совместимы с активным ингредиентом. Эти ветеринарные композиции могут быть введены парентерально, перорально или любым требуемым способом.

#### Способы лечения

В третьем аспекте, изобретение относится к лечению конкретных заболеваний путем применения стимуляторов sGC, либо как таковых, либо в комбинации, или их фармацевтически приемлемых солей или включающих их фармацевтических композиций, у пациента, нуждающегося в этом.

Настоящее изобретение относится к стимуляторам растворимой гуанилатциклазы (sGC), к их фармацевтическим композициям и к их применению, как таковых или в комбинации с одним или более дополнительными лекарственными средствами, для лечения и/или предотвращения различных заболеваний, при которых может быть желательным повышение концентрации NO или повышение концентрации cGMP. Заболевания, которые могут быть подвергнуты лечению, включают, но этим не ограничивая, легочную гипертензию, артериальную гипертензию, сердечную недостаточность, атеросклероз, воспаление, тромбоз, почечный фиброз и почечную недостаточность, цирроз печени, эректильную дисфункцию, сексуальные расстройства у женщин, нарушения, связанные с диабетом, глазные заболевания и другие расстройства, связанные с сердечно-сосудистой системой.

В других вариантах осуществления раскрытые в изобретении соединения являются стимуляторами sGC, которые могут применяться при предотвращении и/или лечении заболеваний или расстройств, характеризующихся нежелательным снижением биологической доступности NO и/или восприимчивости к NO, таких как заболевания или расстройства, связанные с состояниями окислительного стресса или нитрозативного стресса.

В других вариантах осуществления раскрытые в изобретении соединения являются стимуляторами sGC, которые могут применяться при предотвращении и/или лечении заболеваний или расстройств, характеризующихся повышенным нейровоспалением. Одним вариантом осуществления изобретения является способ уменьшения нейровоспаления у субъекта, нуждающегося в этом, путем введения субъекту любого одного из соединений формулы I, III, IV, VI, I-1, I-2, I-3, I-4, I-5, I-12, I-14, I-31, I-32, I-38, I-39, I-41, I-42, I-47, I-48, I-50, I-51, I-53, I-54, I-56 - I-60, I-62 - I-68, I-70, I-71 или его фармацевтически приемлемой соли. В частности, заболевания и расстройства представляют собой заболевание или расстройство центральной нервной системы (CNS).

В других вариантах осуществления раскрытые в изобретении соединения являются стимуляторами sGC, которые могут применяться при предотвращении и/или лечении заболеваний или расстройств, характеризующихся повышенной нейротоксичностью. Одним вариантом осуществления изобретения является способ уменьшения нейротоксичности у субъекта, нуждающегося в этом, путем введения субъекту любого одного из соединений формулы I, III, IV, VI, I-1, I-2, I-3, I-4, I-5, I-12, I-14, I-31, I-32, I-38, I-39, I-41, I-42, I-47, I-48, I-50, I-51, I-53, I-54, I-56 - I-60, I-62 - I-68, I-70, I-71 или его фармацевтически приемлемой соли. В частности, заболевания и расстройства представляют собой заболевание или расстройство центральной нервной системы (CNS).

В других вариантах осуществления раскрытые в изобретении соединения являются стимуляторами sGC, которые могут применяться при предотвращении и/или лечении заболеваний или расстройств, ха-

рактизирующихся нарушением нейрорегенерации. Одним вариантом осуществления изобретения является способ восстановления нейрорегенерации у субъекта, нуждающегося в этом, путем введения субъекту любого одного из соединений формулы I, III, IV, VI, I-1, I-2, I-3, I-4, I-5, I-12, I-14, I-31, I-32, I-38, I-39, I-41, I-42, I-47, I-48, I-50, I-51, I-53, I-54, I-56 - I-60, I-62 - I-68, I-70, I-71 или его фармацевтически приемлемой соли. В частности, заболевания и расстройства представляют собой заболевание или расстройство центральной нервной системы (CNS).

В других вариантах осуществления, раскрытые в изобретении соединения являются стимуляторами sGC, которые могут применяться при предотвращении и/или лечении заболеваний или расстройств, характеризующихся нарушением синаптической функции. Одним вариантом осуществления изобретения является способ восстановления синаптической функции у субъекта, нуждающегося в этом, путем введения субъекту любого одного из соединений формулы I, III, IV, VI, I-1, I-2, I-3, I-4, I-5, I-12, I-14, I-31, I-32, I-38, I-39, I-41, I-42, I-47, I-48, I-50, I-51, I-53, I-54, I-56 - I-60, I-62 - I-68, I-70, I-71 или его фармацевтически приемлемой соли. В частности, заболевания и расстройства представляют собой заболевание или расстройство центральной нервной системы (CNS).

В других вариантах осуществления, раскрытые в изобретении соединения являются стимуляторами sGC, которые могут применяться при предотвращении и/или лечении заболеваний или расстройств, характеризующихся снижением уровня нейротрансмиттеров. Одним вариантом осуществления изобретения является способ нормализации уровня нейротрансмиттеров у субъекта, нуждающегося в этом, путем введения субъекту любого одного из соединений формулы I, III, IV, VI, I-1, I-2, I-3, I-4, I-5, I-12, I-14, I-31, I-32, I-38, I-39, I-41, I-42, I-47, I-48, I-50, I-51, I-53, I-54, I-56 - I-60, I-62 - I-68, I-70, I-71 или его фармацевтически приемлемой соли. Конкретно, заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера. Конкретно, заболевание представляет собой смешанную деменцию.

В другом варианте осуществления, соединения по настоящему изобретению могут быть доставлены в форме имплантированных устройств, таких как стенты. Стент представляет собой сетчатую "трубочку", вставленную в природный проток/канал в организме для предотвращения или противодействия вызванного заболеванием локализованного сужения протока. Термин может также относиться к трубочке, используемой для временного поддержания такого природного канала открытым для обеспечения доступа при хирургическом вмешательстве.

Высвобождающий лекарственное средство стент (DES) представляет собой периферический или коронарный стент (каркас), помещенный в суженные, пораженные болезнью периферические или коронарные артерии, который медленно высвобождает лекарственное средство для блокирования пролиферации клеток, обычно, пролиферации гладкомышечных клеток. Это предотвращает фиброз, который, вместе со сгустками крови (тромбами), может, в противном случае, заблокировать стентированную артерию, процесс, называемый рестенозом. Стент обычно устанавливается внутри периферической или коронарной артерии интервенционным кардиологом или интервенционным радиологом во время пластической операции на сосудах. Лекарственные средства, обычно используемые в DES для блокирования пролиферации клеток, включают паклитаксел или аналоги рапамицина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, стимулятор sGC по изобретению может быть доставлен с помощью высвобождающего лекарственного средства стента, с нанесенным на него слоем указанного стимулятора sGC. Высвобождающий лекарственное средство стент с нанесенным на него слоем стимулятора sGC по изобретению может применяться для предотвращения рестеноза и тромбоза стента в процессе чрескожных хирургических вмешательств на коронарных сосудах. Высвобождающий лекарственное средство стент с нанесенным на него слоем стимулятора sGC по изобретению способен предотвращать пролиферацию гладкомышечных клеток, а также способствовать реваскуляризации и регенерации эндотелия артерии, в которой установлен стент.

Альтернативой чрескожному хирургическому вмешательству на коронарных сосудах для лечения некупируемой стенокардии вследствие окклюзионного заболевания коронарной артерии является метод, называемый шунтированием коронарной артерии (CABG). CABG обеспечивает только временное ослабление поступательного процесса, который дополнительно осложняется быстрым развитием атеросклероза трансплантата. Шунт из подкожной вены является наиболее часто используемым каналом при хирургии CABG. Долговременному положительному клиническому результату в случае венозного CABG препятствуют три основные причины: ускоренный атеросклероз трансплантата, неполная эндотелиализация и тромбоз.

В некоторых вариантах осуществления стимулятор sGC по изобретению может применяться для предотвращения отторжения сафенного трансплантата при CABG. Соединения по настоящему изобретению могут способствовать процессу эндотелиализации и предотвращению тромбоза. С этой целью, стимулятор sGC доставляют местно в форме геля.

Термины "заболевание", "расстройство" и "состояние" могут использоваться в изобретении взаимозаменяемо для обозначения sGC, cGMP и/или NO опосредованного медицинского или патологического состояния.

Используемые в изобретении термины "субъект" и "пациент" являются взаимозаменяемыми. Термины "субъект" и "пациент" относятся к животным (например, птицам, таким как курицы, перепела или



индейки, или к млекопитающим), при этом, в частности, "млекопитающее" включает неприматов (например, коров, свиней, лошадей, овец, кроликов, морских свинок, крыс, кошек, собак и мышей) и приматов (например, обезьяну, шимпанзе и человека), и более конкретно, человека. В некоторых вариантах осуществления субъектом является не принадлежащее к человеческому роду животное, такое как сельскохозяйственное животное (например, лошадь, корова, свинья и овца) или домашнее животное (например, собака, кошка, морская свинка или кролик). В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек.

В настоящем изобретении также предлагается способ лечения одного из упомянутых выше заболеваний, состояний и расстройств у пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли субъекту, нуждающемуся в лечении. В качестве варианта, в изобретении предлагается применение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли при лечении одного из указанных заболеваний, состояний и расстройств у субъекта, нуждающегося в лечении. Кроме того, в изобретении предлагается способ получения лекарственного препарата, применяемого для лечения одного из указанных заболеваний, состояний и расстройств, включающий применение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли.

Используемый в изобретении термин "биологический образец" относится к *in vitro* или *ex vivo* образцу и включает, но без ограничения, клеточные культуры или их экстракты, полученный от млекопитающего биопат или его экстракты, кровь, слюну, мочу, кал, сперму, слезы, лимфатическую жидкость, глазную жидкость, жидкость стекловидного тела, спинномозговую жидкость (CSF) или другие жидкости организма, или их экстракты.

Термины "лечить" или "лечение", используемые применительно к расстройству или заболеванию, обозначают облегчение или устранение причины и/или воздействий расстройства или заболевания. Используемые в изобретении термины "лечить" и "лечение" относятся к снижению или облегчению развития, тяжести и/или продолжительности sGC, cGMP и/или NO опосредованного состояния, или к облегчению одного или более симптомов (предпочтительно одного или более явных симптомов) указанного состояния (то есть к "контролированию" состояния без его "излечения"), в результате применения одного или более терапевтических средств (например, одного или более терапевтических средств, таких как соединение или композиция по изобретению). В конкретных вариантах осуществления термины "лечить" и "лечение" относятся к улучшению, по меньшей мере, одного измеряемого физического показателя sGC, cGMP и/или NO опосредованного состояния. В других вариантах осуществления термины "лечить" и "лечение" относятся к замедлению прогрессирования sGC, cGMP и/или NO опосредованного состояния, или физически, например, путем стабилизации явного симптома, или физиологически, например, путем стабилизации физического показателя, или и того и другого.

Используемый в изобретении термин "предотвращение" относится к введению лекарственного препарата заблаговременно с целью предотвратить или предупредить появление одного или более симптомов заболевания или расстройства. Для специалиста в области медицины является очевидным, что термин "предотвращать" не является абсолютным термином. Следует иметь в виду, что в области медицины этот термин обозначает профилактическое введение лекарственного средства для значительного снижения вероятности возникновения или степени тяжести состояния или симптома состояния, и именно в этом смысле этот термин используется в настоящем изобретении. В настольном справочнике врача по лекарственным препаратам, являющемся стандартным текстом в области медицины, термин "предотвращать" используется сотни раз. Используемые в изобретении термины "предотвращать" и "предотвращение" применительно к расстройству или заболеванию обозначают предотвращение причины, эффектов, симптомов или прогрессирования заболевания или расстройства до полного проявления заболевания или расстройства как такового.

В одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению представляют собой превентивную или "упреждающую" меру для пациента, в частности, для человека, имеющего предрасположенность (например, генетическую предрасположенность) к развитию заболевания, расстройства или симптома, связанных с sGC, cGMP и/или NO.

В других вариантах осуществления способы по настоящему изобретению представляют собой превентивную или "упреждающую" меру для пациента, в частности, для человека, страдающего заболеванием, расстройством или состоянием, которое подвергает его риску развития заболевания, расстройства или симптома, связанных с sGC, cGMP и/или NO.

Описанные в изобретении соединения и фармацевтические композиции могут быть использованы по отдельности или при комбинированной терапии для лечения или предотвращения опосредованного, регулируемого или находящегося под влиянием sGC, cGMP и/или NO заболевания или расстройства.

Описанные в изобретении соединения и композиции могут также применяться в ветеринарии для лечения домашних животных, экзотических животных и сельскохозяйственных животных, включая, но без ограничения, собак, кошек, мышей, крыс, хомяков, песчанок, морских свинок, кроликов, лошадей, свиней и крупной рогатый скот.

### Лекарственные наборы

Описанные в изобретении соединения и фармацевтические композиции могут входить в лекарственный набор. Этот лекарственный набор может включать разовую дозу или многократные дозы двух или более лекарственных средств, каждое из которых расфасовано или приготовлено по отдельности, или разовую дозу или многократные дозы двух или более лекарственных средств, которые расфасованы или приготовлены в комбинированной форме. Соответственно одно или более лекарственных средств могут находиться в первом контейнере, и лекарственный набор может необязательно включать одно или более лекарственных средств во втором контейнере. Контейнер или контейнеры помещают в упаковку, и упаковка может необязательно включать инструкции по применению или по дозированию. Лекарственный набор может включать дополнительные компоненты, такие как шприцы или другие устройства для введения лекарственных средств, а также разбавители или другие средства для приготовления лекарственной формы. Соответственно лекарственные наборы могут включать а) фармацевтическую композицию, содержащую описанное в изобретении соединение и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель, и б) контейнер или упаковку. Лекарственные наборы могут необязательно включать инструкции, описывающие способ применения фармацевтической композиции в одном или более из описанных в изобретении способов (например, для предупреждения или лечения одного или более описанных в изобретении заболеваний и расстройств). Лекарственный набор может необязательно включать вторую фармацевтическую композицию, содержащую одно или более дополнительных лекарственных средств, описанных в изобретении для использования при комбинированной терапии, фармацевтически приемлемый носитель, лекарственную среду или разбавитель. Фармацевтическая композиция, включающая описанное в изобретении соединение, и вторая фармацевтическая композиция, содержащиеся в наборе, могут быть необязательно объединены в одну и ту же фармацевтическую композицию.

Лекарственный набор включает контейнер или упаковку, в которых содержатся фармацевтические композиции, а также может включать разделенные на части контейнеры, такие как разделенный на части флакон или разделенная на части упаковка из фольги. Контейнер может представлять собой, например, бумажную или картонную упаковку, стеклянный или пластиковый флакон или сосуд, повторно герметизируемую упаковку (например, для того чтобы "заполнять" таблетками другой контейнер) или блистерную упаковку с индивидуальными дозами для выдавливания из упаковки в соответствии со схемой лечения. При реализации на рынке лекарственной формы с разовой дозой, целесообразно, чтобы одна упаковка содержала более чем один контейнер. Например, таблетки могут содержаться во флаконе, который, в свою очередь, содержится в коробке.

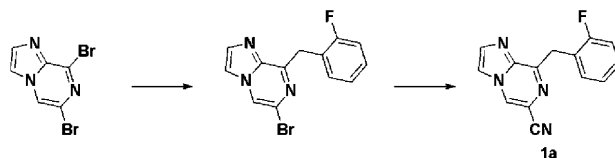
Примером лекарственного набора является так называемая блистерная упаковка. Блистерные упаковки хорошо известны специалистам по производству упаковок, и они широко используются для упаковки лекарственных форм с разовой дозой (таблеток, капсул и других подобных форм). Блистерные упаковки обычно состоят из листа относительно жесткого материала, покрытого фольгой из преимущественно прозрачного пластичного материала. В процессе упаковки в пластичной фольге формируют углубления. Углубления имеют размер и форму, присущую отдельным таблеткам или капсулам, подвергаемым упаковке, или могут иметь размер и форму для размещения множества таблеток и/или капсул, подвергаемым упаковке. Затем таблетки или капсулы соответствующим образом помещают в углубления, и на пластиковой фольге с противоположной углублениям стороны герметически прикрепляют лист относительно жесткого материала. В результате, таблетки или капсулы герметически упаковываются в углублениях между пластичной фольгой и листом, каждая в отдельности или все вместе, по желанию. Предпочтительно, чтобы прочность листа была таковой, что таблетки или капсулы можно было извлекать из блистерной упаковки путем надавливания пальцем руки на углубления, в результате чего образуется отверстие в листе в месте углубления. Таблетка или капсула могут быть извлечены через указанное отверстие.

Может быть желательным вложение в лекарственный набор письменной памятки, содержащей информацию и/или инструкции для врача, фармацевта или субъекта относительно того, когда применять препарат. "Суточная доза" может содержаться в одной таблетке или капсуле, или в нескольких таблетках или капсулах, которые должны быть приняты в данный день. В случае, когда набор содержит отдельные композиции, суточная доза одной или более композиций набора может состоять из одной таблетки или капсулы, в то время как суточная доза другой или более композиций набора может состоять из нескольких таблеток или капсул. Лекарственный набор может иметь форму дозатора, предназначенного для выдачи каждой в отдельности суточных доз в порядке их предполагаемого применения. Дозатор может быть оснащен памяткой, для того чтобы дополнительно облегчить пациенту соблюдение режима лечения. Примером такой памятки является механический счетчик, который указывает количество суточных доз, которые были выданы. Другим примером такой памятки является микросхема памяти с питанием от аккумуляторной батареи в сочетании с жидкокристаллическим считывающим устройством или звуковым сигналом напоминания, который, например, считывает дату принятия последней суточной дозы и/или напоминает, когда следует принять очередную дозу.

## Примеры

Содержание всех цитируемых в примерах публикаций включено в настоящее изобретение путем ссылки на них. Все используемые в изобретении сокращения, символы и обозначения соответствуют тем, которые применяются в современной научной литературе. Смотрите, например, руководство Janet S. Dodd, ed., *The ACS Style Guide: A Manual for Authors and Editors*, 2<sup>nd</sup> Ed., Washington, D.C.: American Chemical Society, 1997, содержание которого включено в настоящее изобретение путем ссылки на него.

Пример 1. Синтезы соединений  
Промежуточное соединение 1a



8-(2-Фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-карбонитрил (1a):

Названное соединение синтезировали в 2 стадии в соответствии с методикой, описанной в патентной литературе (WO 2015/187470A1), в виде желтого твердого вещества (0,60 г, 39% выход за 2 стадии). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, метанол-d<sub>4</sub>) δ (ppm), 9,09 (с, 1H), 8,14 (с, 1H), 7,91 (с, 1H), 7,35 (т, 1H), 7,28 (м, 1H), 7,10 (м, 2H), 4,60 (с, 2H).

Используя методику, аналогичную методике синтеза соединения 1a, получали следующие нитрильные промежуточные соединения. При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

- 8-Фенилимидазо[1,2-а]пиазин-6-карбонитрил;
- 8-бензилимидазо[1,2-а]пиазин-6-карбонитрил;
- 8-(4-фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-карбонитрил;
- 8-(2,3-дифторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-карбонитрил;
- 8-(2,5-дифторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-карбонитрил;
- 8-(3,3,4,4,4-пентафторбутил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-карбонитрил;
- 8-(2-фторбензил)-2-метилимидазо[1,2-а]пиазин-6-карбонитрил;
- 8-(3,5-дифторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-карбонитрил;
- 8-(3,5-дифтор-4-метилбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-карбонитрил.

В качестве варианта, промежуточное соединение 1a и его аналоги (такие как промежуточное соединение 1b) могут быть синтезированы по следующей методике:

Стадия 1. Синтез 6-бром-8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазина

Суспензию сухого порошка цинка (47 г, 720 ммоль, высушенного путем нагревания под вакуумом) в THF (750 мл) обрабатывали 1,2-дибромэтаном (1 мл) и полученную смесь нагревали до 50°C. Затем добавляли хлортриметилсилан (1 мл). После перемешивания при 48-50°C в течение 30 мин смесь охлаждали до температуры окружающей среды. Добавляли сухой хлорид лития (30 г, 710 ммоль, высушенный путем нагревания под вакуумом), затем добавляли по каплям раствор 2-фторбензилбромид (74 г, 390 ммоль) в THF (100 мл) (примечание: реакция экзотермическая, температуру реакции поддерживали ниже 48°C). Смесь перемешивали в течение 1 ч при температуре окружающей среды. Суспензию 6,8-дибромимидазо[1,2-а]пиазина (99 г, 360 ммоль) и Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7,8 г, 11 ммоль) в THF (500 мл) дегазировали путем барботирования азота в течение 10 мин и быстро добавляли к реагенту 2-фторбензилцинка бромиду с помощью THF (100 мл). Реакционный сосуд продували азотом, и смесь перемешивали в течение ночи при температуре окружающей среды до полного расходования исходного материала. Реакцию останавливали насыщенным водным раствором NH<sub>4</sub>Cl (800 мл). Коричневую органическую фазу концентрировали досуха, повторно растворяли в DCM (1,3 л) и фильтровали через слой целита. Органический слой в фильтрате собирали, обесцвечивали активированным углем (45 г), фильтровали через целит и концентрировали досуха. Неочищенный материал сушили азеотропной отгонкой с толуолом (2×500 мл) и использовали на следующей стадии без очистки.

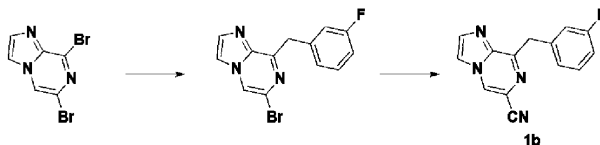
Стадия 2. Синтез 8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-карбонитрила

Реакционную смесь, содержащую неочищенный материал (360 ммоль, теоретический выход) с предыдущей стадии, цианид цинка (35 г, 300 ммоль), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (16 г, 18 ммоль), 1,1'-бис(дифенилрфосфино)ферроцен (dppf) (14 г, 25 ммоль) и порошок цинка (1,0 г) в DMF (800 мл) дегазировали в атмосфере азота в течение 10 мин и затем нагревали при 85°C до полного расходования исходного материала. Реакционную смесь охлаждали до температуры окружающей среды и выливали в EtOAc (1,5 л), 10% раствор NH<sub>4</sub>Cl (1,1 л) и 5% раствор NaCl (1,0 л). Органический слой фильтровали через слой целита и промывали с помощью EtOAc (2×750 мл). Органический фильтрат промывали 10% раствором NaCl (2×1,0 л), обесцвечивали активированным углем (75 г), фильтровали через целит и промывали с помощью EtOAc (2×300 мл). Фильтрат концентрировали досуха и суспендировали в смеси DCM (150 мл) и МТВЕ (300 мл). После перемешивания в течение 1 ч продукт собирали фильтрацией, промывали с помощью МТВЕ (2×100 мл) и сушили в вакуумном сушильном шкафу при 45°C. Названное соединение

получали в виде коричневого твердого вещества (52 г, 57% выход).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, метанол- $d_4$ )  $\delta$  (ppm) 9,09 (с, 1H), 8,13 (с, 1H), 7,91 (с, 1H), 7,35 (кажущийся триплет, 1H), 7,27 (м, 2H), 7,13-7,06 (м, 2H), 4,60 (с, 2H).

Промежуточное соединение 1b.



8-(3-Фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-карбонитрил (1b):

Названное соединение синтезировали в 2 стадии.

Стадия 1. Синтез 6-бром-8-(3-фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазина

Суспензию сухого порошка цинка (2,6 г, 40 ммоль) в THF (50 мл) обрабатывали 1,2-дибромэтаном (0,30 мл, 3,5 ммоль) и полученную смесь нагревали при 50°C в течение 5 мин. Затем добавляли хлортриметилсилан (0,30 мл, 2,4 ммоль) и смесь охлаждали до температуры окружающей среды. Добавляли сухой хлорид лития (1,7 г, 40 ммоль), затем добавляли по каплям раствор 3-фторбензилбромида (4,8 г, 26 ммоль) в THF (25 мл) (примечание: реакция экзотермическая, температуру реакции поддерживали ниже 35°C). Смесь перемешивали в течение 1 ч при температуре окружающей среды, затем добавляли суспензию 6,8-дибромимидазо[1,2-а]пиазина (5,9 г, 21 ммоль) и Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,25 г, 0,36 ммоль) в THF (75 мл). Реакционную смесь дегазировали с помощью азота и перемешивали в течение ночи при температуре окружающей среды до полного расходования исходного материала. Реакционную смесь концентрировали и разбавляли с помощью DCM (100 мл) и 10% раствора NH<sub>4</sub>Cl (100 мл). Густую смесь фильтровали через слой целита и органический слой в фильтрате собирали. Органический слой сушили и обесцвечивали с помощью Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 г) и активированного угля (7 г), фильтровали через целит и концентрировали с получением неочищенного оранжевого масла (7,1 г), которое использовали на следующей стадии без очистки.

Стадия 2. Синтез 8-(3-фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-карбонитрила

Реакционную смесь, содержащую неочищенный материал (21 ммоль, теоретический выход) с предыдущей стадии, цианид цинка (3,0 г, 26 ммоль), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (1,9 г, 2,1 ммоль), 1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен (dppf) (1,5 г, 2,7 ммоль) и порошок цинка (0,30 г, 4,6 ммоль) в DMF (70 мл) дегазировали в атмосфере азота в течение 5 мин и затем нагревали при 110°C до полного расходования исходного материала. Реакционную смесь охлаждали до температуры окружающей среды, разбавляли с помощью EtOAc (150 мл) и фильтровали через слой целита. Органический фильтрат промывали 10% раствором NH<sub>4</sub>Cl (2×100 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали с получением коричневого масла, которое очищали колоночной хроматографией (градиент от 15 до 40% EtOAc/гексаны) с получением названного соединения в виде желтовато-белого твердого вещества (2,4 г, 45% выход).

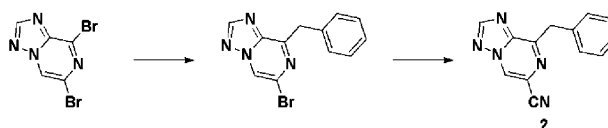
$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 9,37 (с, 1H), 8,25 (с, 1H), 7,98 (с, 1H), 7,29-7,39 (м, 1H), 7,23 (д, 2H), 6,99-7,12 (м, 1H), 4,45-4,56 (м, 2H).

Используя методику, аналогичную методике синтеза промежуточных соединений 1a и 1b, получали следующие нитрильные промежуточные соединения. При необходимости модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

8-(2,6-Дифторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-карбонитрил;

8-(3-фтор-4-метилбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-карбонитрил.

Промежуточное соединение 2.



8-Бензил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-карбонитрил (2).

Названное соединение синтезировали в 2 стадии в соответствии с методикой, описанной в патентной литературе (WO2016/081668A1) в виде остатка золотого цвета (0,12 г, 23% выход за 2 стадии).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 9,96 (с, 1H), 8,94 (с, 1H), 7,39 (д, 2H), 7,30 (дд, 2H), 7,23 (т, 1H), 4,53 (с, 2H).

Используя методику, аналогичную методике синтеза 2, получали следующее нитрильное промежуточное соединение. При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

8-(2-Фторбензил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-карбонитрил;

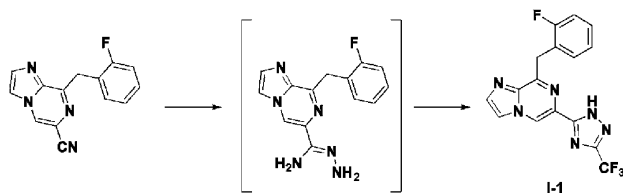
8-(2,3-дифторбензил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-карбонитрил;

8-(3-фторбензил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-карбонитрил;

8-(2,5-дифторбензил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-карбонитрил;

8-(3,5-дифторбензил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-карбонитрил.

## Соединение I-1.



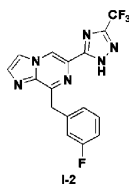
Общая методика А: 8-(2-фторбензил)-6-(3-(трифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)имидазо[1,2-а]пирозин (I-1)

К раствору 8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-а]пирозин-6-карбонитрила (1a) (4,0 г, 16 ммоль) в метаноле (40 мл) добавляли безводный гидразин (3,1 мл, 100 ммоль). После перемешивания при температуре окружающей среды в течение ночи, обнаруживали полное расходование исходного материала. Реакционную смесь концентрировали под вакуумом, оставшийся гидразин удаляли отгонкой с метанолом и толуолом, и полученную пену сушили под вакуумом в течение ночи. Коричневую пену помещали в DCM (75 мл) и добавляли по каплям 2,2,2-трифторуксусный ангидрид (3,8 мл, 27 ммоль) для предотвращения сильно экзотермической реакции. Реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды до полного расходования амидразонового промежуточного соединения. Растворитель удаляли под вакуумом, и сушили до получения желтого остатка. Остаток помещали в AcOH (10 мл) и EtOH (100 мл) и нагревали при 90°C в течение 1 ч. Реакционную смесь охлаждали до температуры окружающей среды и концентрировали до половины реакционного объема. Полученную густую суспензию фильтровали, и фильтрат концентрировали до получения коричневого масла. Неочищенный материал очищали, используя хроматографию на силикагеле (градиент 10-100% EtOAc/гексаны), с получением названного соединения (4,0 г, 69% выход) в виде бежевого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 15,46 (с, 1H), 9,45 (с, 1H), 8,26 (с, 1H), 7,87 (с, 1H), 7,43 (т, 1H), 7,22-7,32 (м, 1H), 7,14-7,22 (м, 1H), 7,09 (т, 1H), 4,60 (с, 2H).

LCMS [M+H]=363,1

Соединение I-2.

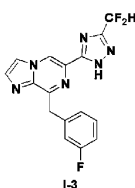


8-(3-Фторбензил)-6-(3-(трифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)имидазо[1,2-а]пирозин (I-2) синтезировали в соответствии с общей методикой А в виде желтовато-белого твердого вещества (170 мг, 60% выход). При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, метанол-d<sub>4</sub>) δ (ppm) 9,22 (с, 1H), 8,17 (с, 1H), 7,87 (с, 1H), 7,35-7,24 (м, 3H), 6,92 (кажущийся триплет, 1H), 4,61 (с, 2H).

LCMS [M+H]=363,2

Соединение I-3.

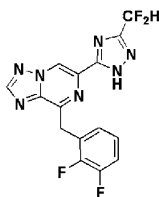


6-(3-(Дифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)-8-(3-фторбензил)имидазо[1,2-а]пирозин (I-3) синтезировали в виде желтовато-белого твердого вещества (160 мг, 55% выход) в соответствии с общей методикой А, за исключением того, что использовали в качестве ацилирующего агента 2,2-дифторуксусный ангидрид. При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, метанол-d<sub>4</sub>) δ (ppm) 9,17 (с, 1H), 8,17 (с, 1H), 7,86 (с, 1H), 7,35-7,25 (м, 3H), 6,92 (м, 1H), 6,90 (т, 1H), 4,61 (с, 2H).

LCMS [M+H]=345,2

Соединение I-17.

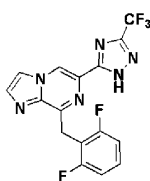
**Соединение I-17**

8-(2,3-Дифторбензил)-6-(3-(дифторметил)-1Н-1,2,4-триазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазирин (I-17) синтезировали в виде белого твердого вещества (120 мг, 62% выход) в соответствии с общей методикой А, за исключением того, что в качестве ацилирующего агента использовали 2,2-дифторуксусный ангидрид. При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

<sup>1</sup>Н ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 15,3 (с, 1Н), 9,58 (с, 1Н), 8,83 (с, 1Н), 7,27-7,35 (м, 2Н), 7,08-7,19 (м, 2Н), 4,69 (с, 2Н).

LCMS [M+H]=364,2

Соединение I-19.

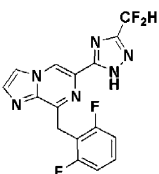
**Соединение I-19**

8-(2,6-Дифторбензил)-6-(3-(трифторметил)-1Н-1,2,4-триазол-5-ил)имидазо[1,2-а]пиазирин (I-19) синтезировали в соответствии с общей методикой А в виде желтовато-белого твердого вещества (300 мг, 87% выход). При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

<sup>1</sup>Н ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 15,3 (с, 1Н), 9,43 (с, 1Н), 8,25 (с, 1Н), 7,85 (с, 1Н), 7,37 (м, 1Н), 7,08 (кажущийся триплет, 2Н), 4,63 (с, 2Н).

LCMS [M+H]=381,2

Соединение I-20.

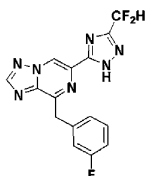
**Соединение I-20**

8-(2,6-Дифторбензил)-6-(3-(дифторметил)-1Н-1,2,4-триазол-5-ил)имидазо[1,2-а]пиазирин (I-20) синтезировали в виде желтовато-белого твердого вещества (240 мг, 72% выход) в соответствии с общей методикой А, за исключением того, что в качестве ацилирующего агента использовали 2,2-дифторуксусный ангидрид. При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

<sup>1</sup>Н ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 14,9 (с, 1Н), 9,38 (с, 1Н), 8,24 (с, 1Н), 7,84 (с, 1Н), 7,37 (м, 1Н), 7,13 (т, 1Н), 7,08 (кажущийся триплет, 2Н), 4,62 (с, 2Н).

LCMS [M+H]=363,2

Соединение I-21.

**Соединение I-21**

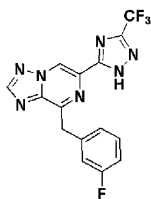
6-(3-(Дифторметил)-1Н-1,2,4-триазол-5-ил)-8-(3-фторбензил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазирин (I-21) синтезировали в виде белого твердого вещества (110 мг, 29% выход) в соответствии с общей методикой А, за исключением того, что в качестве ацилирующего агента использовали 2,2-дифторуксусный ангидрид. При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

<sup>1</sup>Н ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 15,3 (с, 1Н), 9,55 (с, 1Н), 8,83 (с, 1Н), 7,30-7,37 (м, 3Н), 7,19 (т,

1H), 7,04-7,09 (м, 1H), 4, 61 (с, 2H).

LCMS [M+H]=346,2

Соединение I-22.



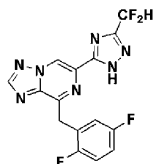
**Соединение I-22**

8-(3-Фторбензил)-6-(3-(трифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин (I-22) синтезировали в соответствии с общей методикой А в виде желтовато-белого твердого вещества (140 мг, 49% выход). При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 15,7 (с, 1H), 9,62 (с, 1H), 8,85 (с, 1H), 7,32 -7,36 (м, 3H), 7,05-7,08 (м, 1H), 4,62 (с, 2H).

LCMS [M+H]=364,2

Соединение I-23.



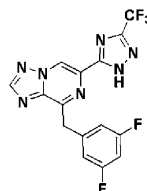
**Соединение I-23**

8-(2,5-Дифторбензил)-6-(3-(дифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин (I-23) синтезировали в виде желтовато-белого твердого вещества (120 мг, 72% выход) в соответствии с общей методикой А, за исключением того, что в качестве ацилирующего агента использовали 2,2-дифторуксусный ангидрид. При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, метанол-d<sub>4</sub>) δ (ppm) 9,49 (с, 1H), 8,65 (с, 1H), 7,25 (м, 1H), 7,11 (м, 1H), 7,01 (м, 1H), 6,91 (т, 1H), 4,71 (с, 2H).

LCMS [M+H]=364,2

Соединение I-24.



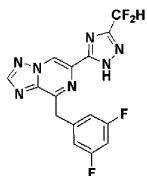
**Соединение I-24**

8-(3,5-Дифторбензил)-6-(3-(трифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин (I-24) синтезировали в соответствии с общей методикой А в виде белого твердого вещества (120 мг, 42% выход). При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 15,7 (с, 1H), 9,63 (с, 1H), 8,86 (с, 1H), 7,23 (д, 2H), 7,11 (т, 1H), 4,63 (с, 2H).

LCMS [M+H]=382,2

Соединение I-25.



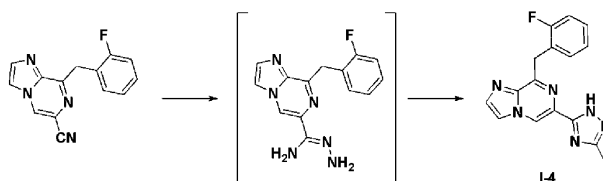
**Соединение I-25**

8-(3,5-Дифторбензил)-6-(3-(дифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин (I-25) синтезировали в виде белого твердого вещества (157 мг, 57% выход) в соответствии с общей методикой А, за исключением того, что в качестве ацилирующего агента использовали 2,2-дифторуксусный ангидрид. При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 15,2 (с, 1H), 9,50 (с, 1H), 8,77 (с, 1H), 7,16 (д, 2H), 7,14 (т, 1H), 7,03 (м, 1H), 4,55 (с, 2H).

LCMS  $[\text{M}+\text{H}]=364,1$

Соединение I-4.



Общая методика В: 8-(2-фторбензил)-6-(3-метил-1H-1,2,4-триазол-5-ил)имидазо[1,2-а]пиразин

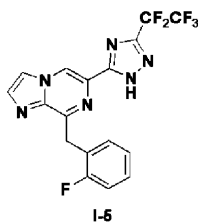
К раствору 8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-а]пиразин-6-карбонитрила (1a) (110 мг, 0,45 ммоль) в метаноле (2,0 мл) добавляли безводный гидразин (0,08 мл, 2,7 ммоль). После перемешивания при температуре окружающей среды в течение 40 ч обнаруживали полное расходование исходного материала. Реакционную смесь концентрировали под вакуумом и остаток сушили под вакуумом в течение ночи. Остаток помещали в DCM (6,0 мл) и добавляли по каплям уксусный ангидрид (0,09 мл, 0,89 ммоль) для предотвращения сильно экзотермической реакции. Реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды до полного расходования амидразонового промежуточного соединения.

Растворитель удаляли под вакуумом и сушили до получения желтого остатка. Остаток помещали в AcOH (0,2 мл) и EtOH (10 мл) и нагревали при 120°C в течение 5 ч в микроволновой печи. Реакционную смесь охлаждали до температуры окружающей среды и концентрировали под вакуумом. Неочищенный материал очищали, используя хроматографию на силикагеле (градиент 10-30% ацетонитрил/MeOH (7:1) в DCM) с получением названного соединения (85 мг, 62% выход) в виде желтовато-белого твердого вещества.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, метанол- $d_4$ )  $\delta$  (ppm) 9,03 (с, 1H), 8,15 (с, 1H), 7,81 (с, 1H), 7,30 (кажущийся триплет, 1H), 7,23 (м, 1H), 7,10-7,02 (м, 2H), 4,66 (с, 2H), 2,48 (с, 3H).

LCMS  $[\text{M}+\text{H}]=309,2$

Соединение I-5.

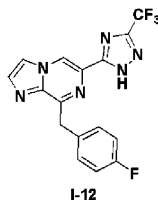


8-(2-Фторбензил)-6-(3-(перфторэтил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)-имидазо[1,2-а]пиразин (соединение I-5) синтезировали в виде твердого вещества (1,5 мг, 1,5% выход) в соответствии с общей методикой В, за исключением того, что в качестве ацилирующего агента использовали 2,2,3,3-пентафторпропановый ангидрид. При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, метанол- $d_4$ )  $\delta$  (ppm) 9,26 (с, 1H), 8,18 (с, 1H), 7,85 (с, 1H), 7,34 (т, 1H), 7,24 (с, 1H), 7,09 (м, 2H), 4,69 (с, 2H).

LCMS  $[\text{M}+\text{H}]=413,2$

Соединение I-12.



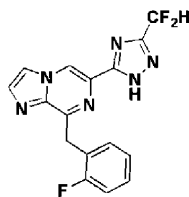
8-(4-Фторбензил)-6-(3-(трифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)имидазо[1,2-а]пиразин (I-12) синтезировали в виде желтовато-белого твердого вещества (75 мг, 84% выход) в соответствии с общей методикой В, за исключением того, что в качестве ацилирующего агента использовали 2,2,2-трифторуксусный ангидрид. При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 15,50 (с, 1H), 9,41 (с, 1H), 8,24 (с, 1H), 7,88 (с, 1H), 7,56 (дд, 2H), 7,10 (дд, 2H), 4,52 (с, 2H).

LCMS  $[\text{M}+\text{H}]=363,2$



## Соединение I-14



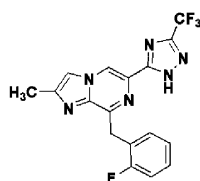
I-14

8-(2-Фторбензил)-6-(3-(дифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)-имидазо[1,2-а]пирозин (I-14) синтезировали в виде желтовато-белого твердого вещества (46 мг, 56% выход) в соответствии с общей методикой В, за исключением того, что в качестве ацилирующего агента использовали 2,2-дифторуксусный ангидрид. При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, метанол- $d_4$ )  $\delta$  (ppm) 9,28 (с, 1H), 8,29 (с, 1H), 8,00 (с, 1H), 7,35 (т, 1H), 7,27 (д, 1H), 7,09 (м, 2H), 6,90 (м, 1H), 4,69 (с, 2H).

LCMS  $[\text{M}+\text{H}]^+=345,2$

Соединение I-31.



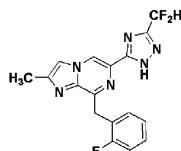
Соединение I-31

8-(2-Фторбензил)-2-метил-6-(3-(трифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)-имидазо[1,2-а]пирозин (I-31) синтезировали в виде белого твердого вещества (35 мг, 55% выход) в соответствии с общей методикой В, за исключением того, что в качестве ацилирующего агента использовали 2,2,2-трифторуксусный ангидрид. При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как реагенты, соотношение, температура и время реакции).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 11,6 (уш. с, 1H), 8,88 (с, 1H), 7,61 (с, 1H), 7,39 (кажущийся триплет, 1H), 7,26-7,32 (м, 1H), 7,09-7,15 (м, 2H), 4,69 (с, 2H), 2,60 (с, 3H).

LCMS  $[\text{M}+\text{H}]^+=377,3$

Соединение I-32.



Соединение I-32

6-(3-(Дифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)-8-(2-фторбензил)-2-метилимидазо[1,2-а]пирозин (I-32) синтезировали в виде белого твердого вещества (44 мг, 85% выход) в соответствии с общей методикой В, за исключением того, что в качестве ацилирующего агента использовали 2,2-дифторуксусный ангидрид. При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как реагенты, соотношение, температура и время реакции).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 11,5 (уш. с, 1H), 8,89 (с, 1H), 7,61 (с, 1H), 7,38 (кажущийся триплет, 1H), 7,26-7,34 (м, 1H), 7,08-7,14 (м, 2H), 6,77 (т, 1H), 4,69 (с, 2H), 2,60 (с, 3H).

LCMS  $[\text{M}+\text{H}]^+=359,2$

Соединение I-38 и соединение I-39.



Соединение I-4

Соединение I-38

Соединение I-39

Общая методика С: 8-(2-фторбензил)-6-(5-метил-1-(2,2,2-трифторэтил)-1H-1,2,4-триазол-3-ил)-имидазо[1,2-а]пирозин (I-38) и 8-(2-фторбензил)-6-(3-метил-1-(2,2,2-трифторэтил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)-имидазо[1,2-а]пирозин (I-39)

К суспензии 8-(2-фторбензил)-6-(3-метил-1H-1,2,4-триазол-5-ил)-имидазо[1,2-а]пирозина (69 мг, 0,22 ммоль) и карбоната калия (68 мг, 0,49 ммоль) в DMF (3,0 мл) добавляли 2,2,2-трифторэтил-трифторметансульфонат (0,050 мл, 0,31 ммоль). После перемешивания при температуре окружающей среды в течение 15 ч реакционную смесь выливали в смесь воды и солевого раствора (1:2, 20 мл) и экс-

рагировали с помощью DCM (2×20 мл).

Объединенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Неочищенный материал очищали, используя хроматографию на силикагеле (градиент 20-100% EtOAc/гексаны), с получением 8-(2-фторбензил)-6-(5-метил-1-(2,2,2-трифторэтил)-1H-1,2,4-триазол-3-ил)имидазо[1,2-а]пиразина (I-38) (18 мг, 21% выход) в виде бледно-желтого твердого вещества и 8-(2-фторбензил)-6-(3-метил-1-(2,2,2-трифторэтил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)имидазо[1,2-а]пиразина (I-39) (52 мг, 60% выход) в виде бледно-желтого твердого вещества. Их химические структуры определяли на основе ядерного эффекта Оверхаузера в экспериментах <sup>1</sup>H ЯМР. В этом случае, возможный третий региоизомер (обычно минорный) не обнаруживали.

Соединение I-38:

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 9,19 (с, 1H), 8,23 (с, 1H), 7,80 (с, 1H), 7,34 (кажущийся триплет, 1H), 7,27 (м, 1H), 7,17 (кажущийся триплет, 1H), 7,08 (кажущийся триплет, 1H), 5,34 (кв, 2H), 4,56 (с, 2H), 2,53 (с, 3H).

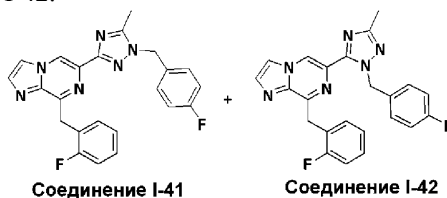
LCMS [M+H]=391,2

Соединение I-39:

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 9,39 (с, 1H), 8,30 (с, 1H), 7,93 (с, 1H), 7,48 (кажущийся триплет, 1H), 7,35 (м, 1H), 7,21-7,15 (м, 2H), 5,41 (кв, 2H), 4,64 (с, 2H), 2,31 (с, 3H).

LCMS [M+H]=391,2

Соединение I-41 и соединение I-42.



8-(2-Фторбензил)-6-(1-(4-фторбензил)-5-метил-1H-1,2,4-триазол-3-ил)имидазо[1,2-а]пиразин (I-41) и 8-(2-фторбензил)-6-(1-(4-фторбензил)-3-метил-1H-1,2,4-триазол-5-ил)имидазо[1,2-а]пиразин (I-42) синтезировали в виде твердых веществ (I-41: 1,3 мг, 3,9% выход и I-42: 2,9 мг, 8,6% выход) в соответствии с общей методикой С, за исключением того, что в качестве алкилирующего агента использовали 1-(бромметил)-4-фторбензол. При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

Соединение I-41:

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 9,15 (с, 1H), 8,21 (с, 1H), 7,79 (с, 1H), 7,32 (м, 3H), 7,21 (м, 4H), 7,08 (кажущийся триплет, 1H), 5,44 (с, 2H), 4,54 (с, 2H), 2,48 (с, 3H).

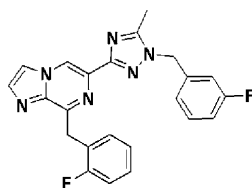
LCMS [M+H]=417,3

Соединение I-42:

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 9,34 (с, 1H), 8,29 (с, 1H), 7,91 (с, 1H), 7,37 (кажущийся триплет, 1H), 7,20 (м, 1H), 7,03 (м, 6H), 5,61 (с, 2H), 4,63 (с, 2H), 2,25 (с, 3H).

LCMS [M+H]=417,4

Соединение I-47.



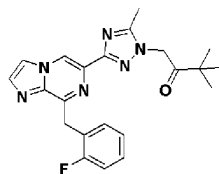
Соединение I-47

8-(2-Фторбензил)-6-(1-(3-фторбензил)-5-метил-1H-1,2,4-триазол-3-ил)имидазо[1,2-а]пиразин (I-47) синтезировали в виде твердого вещества (4,2 мг, 12% выход) в соответствии с общей методикой С, за исключением того, что в качестве алкилирующего агента использовали 1-(бромметил)-3-фторбензол. Другой региомер не выделяли. При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, метанол-d<sub>4</sub>) δ (ppm) 9,04 (с, 1H), 8,11 (с, 1H), 7,78 (с, 1H), 7,38 (м, 1H), 7,23 (м, 2H), 7,06 (м, 5H), 5,47 (с, 2H), 4,65 (с, 2H), 2,51 (с, 3H).

LCMS [M+H]=417,4

Соединение I-48.



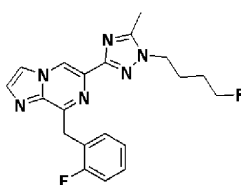
Соединение I-48

1-(3-(8-(2-Фторбензил)имидазо[1,2-а]пиразин-6-ил)-5-метил-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)-3,3-диметилбутан-2-он (I-48) синтезировали в виде твердого вещества (7,6 мг, 23% выход) в соответствии с общей методикой С, за исключением того, что в качестве алкилирующего агента использовали 1-бром-3,3-диметилбутан-2-он. Другой региомер не выделяли. При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 9,15 (с, 1H), 8,22 (с, 1H), 7,79 (с, 1H), 7,32 (кажущийся триплет, 1H), 7,25 (м, 1H), 7,17 (кажущийся триплет, 1H), 7,08 (кажущийся триплет, 1H), 5,54 (с, 2H), 4,54 (с, 2H), 2,31 (с, 3H), 1,22 (с, 9H).

LCMS [M+H]=407,4

Соединение I-50.



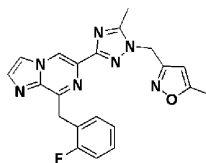
Соединение I-50

8-(2-Фторбензил)-6-(1-(4-фторбутил)-5-метил-1Н-1,2,4-триазол-3-ил)имидазо[1,2-а]пиразин (I-50) синтезировали в виде твердого вещества (0,9 мг, 2,8% выход) в соответствии с общей методикой С, за исключением того, что в качестве алкилирующего агента использовали 1-бром-4-фторбутан. Другой региомер не выделяли. При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, метанол- $d_4$ )  $\delta$  (ppm) 9,03 (с, 1H), 8,14 (с, 1H), 7,81 (с, 1H), 7,26 (м, 2H), 7,06 (м, 2H), 4,67 (с, 2H), 4,55 (т, 1H), 4,45 (т, 1H), 4,27 (т, 2H), 2,56 (с, 3H), 2,05 (м, 2H), 1,77 (м, 2H).

LCMS [M+H]=383,3

Соединение I-51.



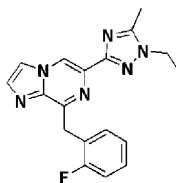
Соединение I-51

3-((3-(8-(2-Фторбензил)имидазо[1,2-а]пиразин-6-ил)-5-метил-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-метилизоксазол (I-51) синтезировали в виде твердого вещества (4,1 мг, 13% выход) в соответствии с общей методикой С, за исключением того, что в качестве алкилирующего агента использовали 3-(бромметил)-5-метилизоксазол. Другой региомер не выделяли. При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, метанол- $d_4$ )  $\delta$  (ppm) 9,05 (с, 1H), 8,13 (с, 1H), 7,80 (с, 1H), 7,26 (м, 2H), 7,08 (м, 1H), 7,04 (м, 1H), 6,20 (с, 1H), 5,50 (с, 2H), 4,66 (с, 2H), 2,58 (с, 3H), 2,42 (с, 3H).

LCMS [M+H]=404,3

Соединение I-53.



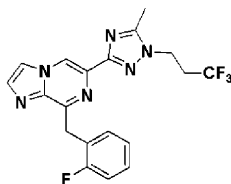
Соединение I-53

6-(1-Этил-5-метил-1Н-1,2,4-триазол-3-ил)-8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-а]пиразин (I-53) синтезировали в виде твердого вещества (3,0 мг, 11% выход) в соответствии с общей методикой С, за исключением того, что в качестве алкилирующего агента использовали йодэтан. Другой региомер не выделяли. При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, метанол-d<sub>4</sub>) δ (ppm) 9,02 (с, 1H), 8,13 (с, 1H), 7,81 (с, 1H), 7,25 (м, 2H), 7,08 (м, 1H), 7,04 (м, 1H), 4,67 (с, 2H), 4,26 (кв, 2H), 2,56 (с, 3H), 1,50 (т, 3H).

LCMS [M+H]=337,3

Соединение I-54.



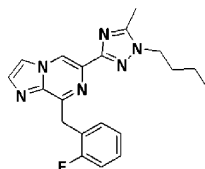
Соединение I-54

8-(2-Фторбензил)-6-(5-метил-1-(3,3,3-трифторпропил)-1H-1,2,4-триазол-3-ил)имидазо[1,2-a]пирозин (I-54) синтезировали в виде твердого вещества (2,9 мг, 8,8% выход) в соответствии с общей методикой С, за исключением того, что в качестве алкилирующего агента использовали 3-бром-1,1,1-трифторпропан. Другой региомер не выделяли. При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, метанол-d<sub>4</sub>) δ (ppm) 9,06 (с, 1H), 8,14 (с, 1H), 7,81 (с, 1H), 7,25 (м, 2H), 7,09 (м, 1H), 7,04 (м, 1H), 4,67 (с, 2H), 4,49 (т, 2H), 2,94 (м, 2H), 2,57 (с, 3H).

LCMS [M+H]=405,3

Соединение I-56.



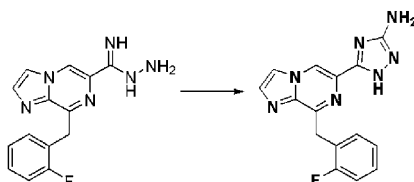
Соединение I-56

6-(1-Бутил-5-метил-1H-1,2,4-триазол-3-ил)-8-(2-фторбензил)-имидазо[1,2-a]пирозин (I-56) синтезировали в виде твердого вещества (2,0 мг, 6,8% выход) в соответствии с общей методикой С, за исключением того, что в качестве алкилирующего агента использовали 1-бромбутан. Другой региомер не выделяли. При необходимости, модифицировали условия реакции (такие как соотношение реагентов, температура и время реакции).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, метанол-d<sub>4</sub>) δ (ppm) 9,02 (с, 1H), 8,14 (с, 1H), 7,80 (с, 1H), 7,26 (м, 2H), 7,08 (м, 1H), 7,04 (м, 1H), 4,67 (с, 2H), 4,22 (т, 2H), 2,55 (с, 3H), 1,90 (app. quin, 2H), 1,41 (м, 2H), 1,00 (т, 3H).

LCMS [M+H]=365,3

Соединение I-57.



Соединение I-57

5-(8-(2-Фторбензил)имидазо[1,2-a]пирозин-6-ил)-1H-1,2,4-триазол-3-ин-2-ил-амин (I-57):

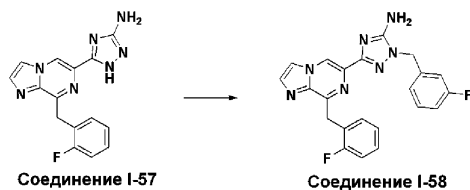
Суспензию полусульфатной соли S-метилизотиомочевины (510 мг, 1,8 ммоль), 8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-a]пирозин-6-карбоксимидгидразида (520 мг, 1,8 ммоль) и гидроксида натрия (73 мг, 1,8 ммоль) в воде (8 мл) нагревали до 120°C в течение 60 мин в микроволновой печи. Реакционную смесь фильтровали, используя метанол в качестве элюента, и полученный фильтрат концентрировали с получением неочищенного продукта. Этот материал очищали методом ВЭЖХ с обращенной фазой (градиент 12-37% ацетонитрил/вода с 0,1% трифторуксусной кислотой) с получением оранжевого масла, которое представляла собой смесь 2 соединений (360 мг). Полученную смесь использовали в последующих реакциях без дополнительной очистки.

Небольшой образец этого материала дополнительно очищали методом ВЭЖХ с обращенной фазой (градиент 10-55% ацетонитрил/вода с 0,1% муравьиной кислотой) с получением 5-(8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-a]пирозин-6-ил)-1H-1,2,4-триазол-3-ина (I-57) (3,0 мг) в виде белого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 12,1 (уш. с, 1H), 8,92 (уш. с, 1H), 8,21 (с, 1H), 7,77 (с, 1H), 7,35-7,40 (м, 1H), 7,25-7,29 (м, 1H), 7,15-7,19 (м, 1H), 7,06-7,11 (м, 1H), 6,09 (с, 2H), 4,53 (с, 2H).

LCMS [M+H]=310,1

Соединение I-58.



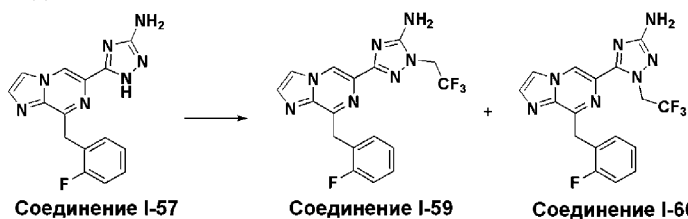
1-(3-Фторбензил)-3-(8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-ил)-1Н-1, 2,4-триазол-5-амин (I-58):

К раствору неочищенного 5-(8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-а]-пиазин-6-ил)-1Н-1,2,4-триазол-3-амин (360 мг) в DMF (4 мл) добавляли 1-(бромметил)-3-фторбензол (0,11 мл, 0,88 ммоль), затем карбонат калия (210 мг, 1,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 16 ч и затем нагревали до 50°C в течение 24 ч. Реакционную смесь охлаждали до температуры окружающей среды, разбавляли водой (50 мл) и экстрагировали с помощью EtOAc (4×30 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали с получением коричневого остатка. Первое проведение очистки неочищенного продукта хроматографией на силикагеле давала смесь. Дополнительная очистка этого материала методом ВЭЖХ с обращенной фазой (градиент 10-60% ацетонитрил/вода с 0,1% трифторуксусной кислотой) давала 1-(3-фторбензил)-3-(8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-ил)-1Н-1,2,4-триазол-5-амин (I-58) (6,9 мг), в виде бледно-желтого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 9,01 (с, 1H), 8,22 (с, 1H), 7,81 (с, 1H), 7,40-7,44 (м, 1H), 7,30-7,34 (м, 1H), 7,24-7,27 (м, 1H), 7,12-7,18 (м, 2H), 7,06-7,10 (м, 3H), 6,78 (уш. с, 2H), 5,25 (с, 2H), 4,52 (с, 2H).

LCMS [M+H]=418,3

Соединение I-59 и соединение I-60.



3-(8-(2-Фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-ил)-1-(2,2,2-трифторэтил)-1Н-1,2,4-триазол-5-амин (I-59) и 5-(8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-ил)-1-(2,2,2-трифторэтил)-1Н-1,2,4-триазол-3-амин (I-60):

Суспензию неочищенного 5-(8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-ил)-1Н-1,2,4-триазол-3-амин (550 мг), 2,2,2-трифторэтилтрифторметансульфоната (0,30 мл, 2,2 ммоль) и карбоната калия (540 мг, 3,90 ммоль) в DMF (4 мл) перемешивали в течение 16 ч при температуре окружающей среды. Реакционную смесь затем разбавляли водой (50 мл) и экстрагировали с помощью EtOAc (3×50 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали с получением остатка. Первую очистку проводили с помощью хроматографии на силикагеле (градиент 0-100% EtOAc/гексаны). Вторая очистка с использованием хроматографии на силикагеле (градиент 0-50% ацетонитрил/MeOH (7:1) в DCM) давала 5-(8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-ил)-1-(2,2,2-трифторэтил)-1Н-1,2,4-триазол-3-амин (I-60) (40 мг) в виде твердого вещества золотого цвета. При этом эксперимента обнаруживали и соединение I-59, но не выделяли его.

Во втором эксперименте, смешивали неочищенный 5-(8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-ил)-1Н-1,2,4-триазол-3-амин (330 мг), 2,2,2-трифторэтилтрифторметансульфонат (0,18 мл, 1,3 ммоль) карбонат калия (320 мг, 2,4 ммоль) в DMF (4 мл) с получением аналогичной смеси продуктов. Очистка этой реакционной смеси с использованием метода ВЭЖХ с обращенной фазой (градиент 10-55% ацетонитрил/вода с 0,1% муравьиной кислотой) давала 3-(8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-ил)-1-(2,2,2-трифторэтил)-1Н-1,2,4-триазол-5-амин (I-59) (3,5 мг) в виде белого твердого вещества.

Соединение I-60:

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 9,19 (с, 1H), 8,31 (д, 1H), 7,92 (д, 1H), 7,45-7,50 (м, 1H), 7,30-7,36 (м, 1H), 7,14-7,20 (м, 2H), 5,64 (с, 2H), 5,21 (кв, 2H), 4,62 (с, 2H).

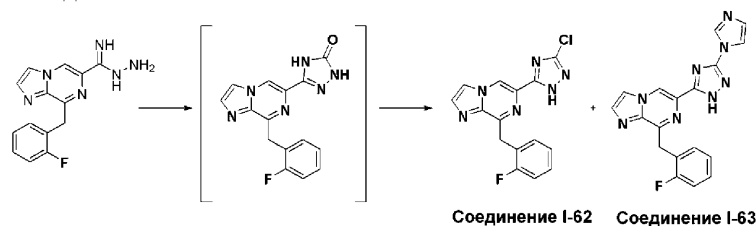
LCMS [M+H]=392,2

Соединение I-59:

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 8,98 (с, 1H), 8,22 (с, 1H), 7,78 (с, 1H), 7,30-7,34 (м, 1H), 7,24-7,29 (м, 1H), 7,15-7,19 (м, 1H), 7,06-7,09 (м, 1H), 6,76 (с, 2H), 4,98 (кв, 2H), 4,43 (с, 2H). Региохимические отнесения подтверждались ядерным эффектом Оверхаузера экспериментами <sup>1</sup>H ЯМР (~3% ядерного эффекта Оверхаузера обнаруживается между CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> протонами и NH<sub>2</sub> группой).

LCMS [M+H]=392,2

Соединение I-62 и соединение I-63.



Соединение I-62 Соединение I-63

6-(3-Хлор-1Н-1,2,4-триазол-5-ил)-8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин (I-62) и 6-(3-(1Н-имидазол-1-ил)-1Н-1,2,4-триазол-5-ил)-8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин (I-63):

Раствор, содержащий 8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-карбоксимидгидразид (140 мг, 0,51 ммоль) и 1,1'-карбонилдимидазол (CDI) (410 мг, 2,5 ммоль) в THF (4 мл), перемешивали при температуре окружающей среды в течение 40 ч. Наблюдали образование бежевой суспензии. Добавляли DCM/MeOH (60 мл, соотношение 1:1) и полученную смесь осторожно подогрели для растворения твердых веществ. Неочищенную смесь концентрировали и сушили под вакуумом. Добавляли фосфорилтрихлорид (3,0 мл, 32 ммоль) и полученную смесь нагревали при 120°C в течение 16 ч. Реакционную смесь концентрировали, осторожно обрабатывали льдом и нейтрализовывали насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub>. Неочищенную смесь экстрагировали с помощью DCM/изопропанол (соотношение 5:1, 3×20 мл). Объединенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали под вакуумом. Очистка хроматографией на силикагеле (0-25% ацетонитрил/MeOH (7:1) в DCM) давала названные соединения I-62 (23 мг, 14% выход, первый элюируемый продукт) в виде желтовато-белого твердого вещества и I-63 (18 мг, 9,9% выход, второй элюируемый побочный продукт) в виде светло-бежевого твердого вещества.

Соединение I-62:

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 14,9 (с, 1H), 9,31 (с, 1H), 8,25 (с, 1H), 7,85 (с, 1H), 7,43 (кажущийся триплет, 1H), 7,27 (м, 1H), 7,17 (кажущийся триплет, 1H), 7,09 (кажущийся триплет, 1H), 4,58 (с, 2H).

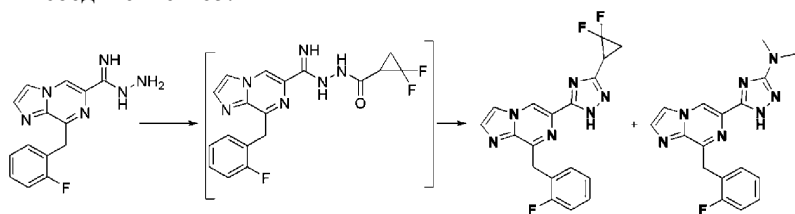
LCMS [M+H]=329,2

Соединение I-63:

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 14,8 (с, 1H), 9,36 (с, 1H), 8,32 (м, 2H), 7,86 (с, 1H), 7,76 (с, 1H), 7,43 (кажущийся триплет, 1H), 7,28 (м, 1H), 7,20-7,15 (м, 2H), 7,10 (кажущийся триплет, 1H), 4,60 (с, 2H).

LCMS [M+H]=361,3

Соединение I-64 и соединение I-65.



Соединение I-64 Соединение I-65

6-(3-(2,2-Дифторциклопропил)-1Н-1,2,4-триазол-5-ил)-8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин (I-64) и 5-(8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-ил)-N,N-диметил-1Н-1,2,4-триазол-3-амин (I-65):

Раствор 2,2-дифторциклопропан-1-карбоновой кислоты (89 мг, 0,70 ммоль) в DMF (2,0 мл) обрабатывали последовательно NATU (400 мг, 1,0 ммоль) и 4-метилморфолином (0,23 мл, 2,1 ммоль). Раствор янтарного цвета перемешивали при температуре окружающей среды в течение 30 мин и затем добавляли к 8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-карбоксимидгидразиду (200 мг, 0,70 ммоль) с помощью 0,50 мл DMF. Через 18 ч реакционную смесь разбавляли с помощью EtOAc (100 мл) и воды (50 мл). Водный слой повторно экстрагировали с помощью EtOAc (25 мл). Объединенные органические слои промывали солевым раствором, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали под вакуумом с получением 2,2-дифтор-N'-((8-(2-фторбензил)имидазо[1,2-а]пиазин-6-ил)имино)метилциклопропан-1-карбогидразида (400 мг, >99% выход) в виде коричневого твердого вещества, который использовали без дополнительных очисток. Это промежуточное соединение суспендировали в этаноле (10 мл) и уксусной кислоте (1,0 мл). Реакционную смесь нагревали при 90°C в течение 15,5 ч. Содержимое концентрировали под вакуумом и полученный остаток очищали два раза хроматографией на силикагеле (градиент 20-10% EtOAc/гексаны и градиент 0-4% ацетонитрил/MeOH (7:1) в DCM) и повторно очищали методом ВЭЖХ с обращенной фазой (5-95% ацетонитрил/вода с 0,1% муравьиной кислотой) с получением названных соединений I-64 (51 мг, 19% выход, первый элюируемый продукт) в виде белого твердого вещества и I-65 (20 мг, 8,5% выход, второй элюируемый побочный продукт) в виде желтовато-белого твердого вещества.

Соединение I-64:

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, метанол-d<sub>4</sub>) δ (ppm) 9,12 (с, 1H), 8,16 (с, 1H), 7,83 (с, 1H), 7,32 (м, 1H), 7,25 (м,

1H), 7,11-7,02 (м, 2H), 4,67 (с, 2H), 2,97 (м, 1H), 2,17 (м, 1H), 2,00 (м, 1H).

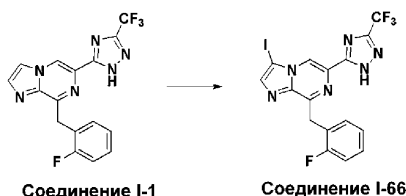
LCMS [M+H]=371,2

Соединение I-65:

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, метанол-d<sub>4</sub>) δ (ppm) 9,08 и 8,98 (с, 1H, таутомеры), 8,13 и 8,10 (с, 1H, таутомеры), 7,87 и 7,77 (с, 1H, таутомеры), 7,36-7,16 (м, 2H), 7,13-6,98 (м, 2H), 4,64 (с, 2H), 3,09 и 3,03 (с, 6H, таутомеры).

LCMS [M+H]=338,2

Соединение I-66.



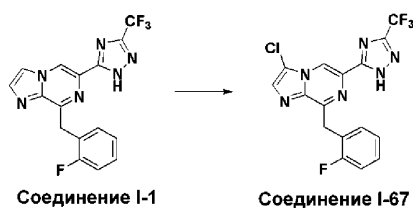
8-(2-Фторбензил)-3-йод-6-(3-(трифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)имидазо[1,2-а]пирозин (I-66):

Раствор 8-(2-фторбензил)-6-(3-(трифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)имидазо[1,2-а]пирозина (99 мг, 0,27 ммоль) в DMF (2,0 мл) обрабатывали N-йодсукцинимидом (92 мг, 0,41 ммоль) и нагревали до 60°C в течение 40 ч. Реакционную смесь концентрировали и очищали хроматографией на силикагеле (градиент 0-5% ацетонитрил/MeOH (7:1) в DCM) с получением названного соединения (I-66) (130 мг, 96% выход) в виде белого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 15,6 (с, 1H), 8,79 (с, 1H), 8,04 (с, 1H), 7,41 (кажущийся триплет, 1H), 7,27 (м, 1H), 7,18 (кажущийся триплет, 1H), 7,08 (кажущийся триплет, 1H), 4,62 (с, 2H).

LCMS [M+H]=489,2

Соединение I-67.



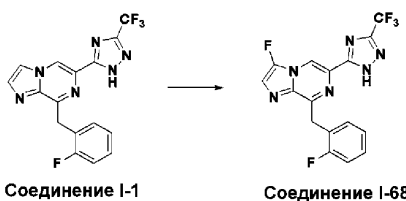
3-Хлор-8-(2-фторбензил)-6-(3-(трифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)имидазо[1,2-а]пирозин (I-67):

Раствор 8-(2-фторбензил)-6-(3-(трифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)имидазо[1,2-а]пирозина (99 мг, 0,27 ммоль) в DMF (2,0 мл) обрабатывали N-хлорсукцинимидом (55 мг, 0,41 ммоль) и нагревали до 60°C в течение 24 ч. Реакционную смесь концентрировали и очищали хроматографией на силикагеле (градиент 0-20% ацетонитрил/MeOH (7:1) в DCM) с получением названного соединения (I-67) (56 мг, 51% выход) в виде белого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, метанол-d<sub>4</sub>) δ (ppm) 9,04 (с, 1H), 7,88 (с, 1H), 7,39 (кажущийся триплет, 1H), 7,26 (м, 1H), 7,08 (м, 2H), 4,70 (с, 2H).

LCMS [M+H]=397,2

Соединение I-68.



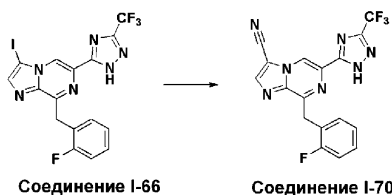
3-Фтор-8-(2-фторбензил)-6-(3-(трифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)имидазо[1,2-а]пирозин (I-68)

Раствор 8-(2-фторбензил)-6-(3-(трифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)имидазо[1,2-а]пирозина (100 мг, 0,28 ммоль) в ацетонитриле (3,0 мл) обрабатывали 1-хлорметил-4-фтор-1,4-дiazонийбицикло[2.2.2]октанбис(тетрафторборатомом) (Selectfluor®) (120 мг, 0,34 ммоль) и нагревали до 70°C в течение 6 ч. Вводили дополнительное количество Selectfluor® (60 мг, 0,17 ммоль) и продолжали нагревание при 70°C в течение 3 ч. Реакционную смесь концентрировали и очищали хроматографией на силикагеле (градиент 0-20% ацетонитрил/MeOH (7:1) в DCM) с получением названного соединения I-68 (10 мг, 9,4% выход) в виде белого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, метанол-d<sub>4</sub>) δ (ppm) 8,96 (с, 1H), 7,56 (д, 1H), 7,39 (кажущийся триплет, 1H), 7,25 (м, 1H), 7,08 (м, 2H), 4,65 (с, 2H).

LCMS [M+H]=381,2

## Соединение I-70



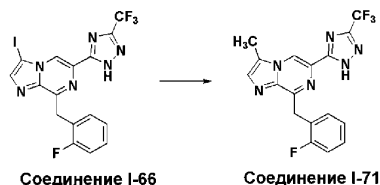
8-(2-Фторбензил)-6-(3-(трифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)имидазо[1,2-а]пиразин-3-карбонитрил (I-70):

Твердую смесь, содержащую 8-(2-фторбензил)-3-йод-6-(3-(трифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)имидазо[1,2-а]пиразин (49 мг, 0,10 ммоль), цианид цинка (18 мг, 0,15 ммоль), [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий(II) (3,7 мг, 5,0 мкмоль) и порошок цинка (1,3 мг, 0,020 ммоль), продували азотом в течение 15 мин. Добавляли DMF (2 мл) и реакционную смесь нагревали при 120°C в микроволновой печи в течение 7,5 ч, в течение которых вводили дополнительные количества палладиевого катализатора (3,7 мг) и цианида цинка (24 мг) для ускорения реакции. Неочищенную смесь охлаждали до температуры окружающей среды, разбавляли с помощью EtOAc (10 мл) и фильтровали через слой целита, используя EtOAc (20 мл). Органический фильтрат промывали смесью вода/солевой раствор (2×10 мл, соотношение 10:1) и соевым раствором (10 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали под вакуумом. Очистка хроматографией на силикагеле (градиент 0-10% ацетонитрил/MeOH (7:1) в DCM) давала названное соединение I-70 в виде желтовато-белого твердого вещества (15 мг, 38% выход).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, метанол-d<sub>4</sub>) δ (ppm) 9,23 (с, 1H), 8,44 (с, 1H), 7,41 (кажущийся триплет, 1H), 7,26 (м, 1H), 7,10-7,05 (м, 2H), 4,74 (с, 2H).

LCMS [M+H]=388,3

Соединение I-71.



8-(2-Фторбензил)-3-метил-6-(3-(трифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)имидазо[1,2-а]пиразин (I-71):

Твердую смесь, содержащую 8-(2-фторбензил)-3-йод-6-(3-(трифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-ил)имидазо[1,2-а]пиразин (71 мг, 0,15 ммоль), карбонат калия (60 мг, 0,44 ммоль) и тетракис(трифенилфосфин)палладий(0) (17 мг, 0,015 ммоль), продували азотом в течение 5 мин. Добавляли DME (3,5 мл) и воду (0,5 мл), затем триметилбороксин (37 мкл, 0,29 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 100°C в течение 5 ч и затем при 120°C в течение 1 ч. Вводили дополнительные количества палладиевого катализатора (17 мг) и триметилбороксина (37 мкл) и реакционную смесь нагревали при 120°C в течение 40 ч. Неочищенную смесь охлаждали до температуры окружающей среды, выливали в воду (20 мл) и нейтрализовывали до pH 7 с помощью 1 N раствора HCl. Водную смесь экстрагировали с помощью EtOAc (2×20 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали под вакуумом. Очистка хроматографией на силикагеле (градиент 0-40% EtOAc/гексаны) и методом ВЭЖХ с обращенной фазой (градиент 30-80% ацетонитрил/вода с 0,1% муравьиной кислотой) давала названное соединение I-71 в виде белого твердого вещества (16 мг, 29% выход).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, метанол-d<sub>4</sub>) δ (ppm) 8,99 (с, 1H), 7,66 (с, 1H), 7,33 (кажущийся триплет, 1H), 7,24 (м, 1H), 7,11-7,03 (м, 2H), 4,67 (с, 2H), 2,63 (с, 3H).

LCMS [M+H]=377,2

Пример 2а. Определение биологической активности методом клеточного анализа cGMP GloSensor в 384-луночном формате

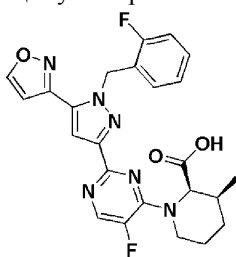
Для оценки активности испытуемых соединений использовали человеческие эмбриональные клетки почек (HEK293), экспрессирующие биосенсор GloSensor™ 40F cGMP (Part No: CS182801, Promega). Люминесцентные биосенсоры (сконструированная люцифераза), которые вводили в эти клетки, детектируют cGMP, образованный соединениями, стимулирующими фермент sGC, и излучают люминесценцию. cGMP GloSensor клетки хранили в среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM), дополненной фетальной бычьей сывороткой (FBS, конечная концентрация 10%) и гидромицином (200 мкг/мл). За сутки до проведения исследования, клетки высевали в DMEM с 10% FBS в объеме 50 мкл при плотности 1,5×10<sup>4</sup> клеток/луночка в 384-луночном планшете с плоским белым дном с нанесенным слоем поли-D-лизина (Corning Cat No 35661). Клетки инкубировали в течение ночи при 37°C в увлажненной камере с 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день, среду удаляли, и клетки заменяли на 40 мкг/луночка GloSensor™, 2 mM (Promega Cat No E1291). Клетки обрабатывали в течение 90 мин при 25°C для приведения субстрата



в клетках в равновесное состояние. Испытуемые соединения и диэтилентриамин NONOate (DETA-NONOate или DETA-NO) разбавляли до 3 мМ (20×) в бессывороточной CO<sub>2</sub> независимой среде и последовательно разбавляли при 4-кратных разбавлениях для получения 5X дозовой кривой, из которой 10 мкл добавляли в лунки (концентрация × мкМ для раствора испытуемого соединения и концентрация 10 мкМ для раствора DETA-NONOate; где x представляет собой одну из следующих конечных концентраций: 30000, 7500, 1875, 468,8, 117,2, 29,29, 7,320, 1,830, 0,460, 0,114 и 0,029 нМ).

В случае проведения кинетических исследований люминесценции измеряли незамедлительно в течение 0,2 с на лунку с помощью планшет-ридера Envision (Perkin Elmer). Для итогового скрининга зависимости активности лекарственного средства от структуры (SAR), данные собирали после 55 мин инкубации при комнатной температуре.

Данные нормировали относительно контрольного образца с высокой активностью, используя следующее уравнение:  $100 \cdot (\text{образец контрольный} / \text{образец с высокой активностью}) / (\text{образец с высокой активностью} - \text{образец с низкой активностью})$ , где контрольный образец с низкой активностью представляет собой среднее значения для 16 образцов, обработанных с помощью 1% DMSO, и контрольный образец с высокой активностью представляет собой среднее значения для 16 образцов, обработанных с помощью 30 мкМ соединения Y, изображенного ниже. Данные аппроксимировали с помощью 4-х параметрической аппроксимирующей кривой (log(агонист) против терапевтического эффекта - кривая с переменным углом наклона), используя программное обеспечение GraphPad Prism Software v.5. Для всех соединений n=2. Абсолютную величину (Abs) EC<sub>50</sub> получали из аппроксимирующей кривой путем интерполяции, и определяли ее как концентрацию, при которой данное соединение вызывает 50% терапевтического эффекта контрольного образца с высокой активностью после нормализации данных, как указано выше. Соединения, которые были неспособны обеспечивать 50% минимального терапевтического эффекта, регистрируются как >30 мкМ или ND. Для соединений, которые испытывали в двух экземплярах или для которых n выше 2, приводимый результат представляет собой среднее геометрическое значение для нескольких полученных результатов. В табл. 2а приведены результаты, полученные для выбранных соединений по настоящему изобретению в этом исследовании.



Соединение Y

Таблица 2а. Цельноклеточная активность в GloSensor клеточном анализе, 384-луночный формат (пример 2а)

Соединение	Abs EC <sub>50</sub> (нМ)
I-1	A
I-2	A
I-3	B
I-4	B
I-5	A
I-12	B
I-14	A
I-31	B
I-32	C
I-38	A
I-39	
I-41	A
I-42	C
I-47	A
I-48	A
I-50	B
I-51	A
I-53	B
I-54	B
I-56	A
I-57	B
I-58	A
I-59	A
I-60	C
I-62	A
I-63	B
I-64	B
I-65	B
I-66	B
I-67	A
I-68	A
I-70	B
I-71	A

Величины ферментативной активности sGC в клетках НЕК, определенные анализом GloSensor. (~) Расшифровки условных обозначений для величин ферментативной активности sGC, выраженных абсолютной величиной EC<sub>50</sub>, которую определяют как концентрацию, при которой данное соединение вызывает 50% терапевтического эффекта контрольного образца с высокой активностью (соединение Y) после нормализации данных: Abs EC<sub>50</sub> ≤ 100 нМ=A; 100 нМ < Abs EC<sub>50</sub> ≤ 1000 нМ=B; 1000 нМ < Abs EC<sub>50</sub>=C. Соединения, которые были неспособны обеспечивать 50% минимального терапевтического эффекта, регистрируются как > 30 мкМ или ND.

Пример 2b. Определение биологической активности методом клеточного анализа cGMP GloSensor в 384-луночном формате

Клетки НЕК293, экспрессирующие GloSensor™ 40F cGMP (Part No: CS182801, Promega), использовали для оценки синергетического действия испытуемых соединений в сочетании с NO. Проводили несколько анализов, при которых изменяли концентрации испытуемого соединения, а также концентрацию диэтилентриамин NONOate (DETA-NONOate), для выявления синергетического действия испытуемого соединения в сочетании с NO. Испытуемые соединения и диэтилентриамин NONOate (DETA-NONOate или DETA-NO) разбавляли до 3 мМ (20x) в бессывороточной CO<sub>2</sub> независимой среде и последовательно разбавляли при 4-кратных разбавлениях для получения 5X дозовой кривой, из которой 10 мкл добавляли в лунки (концентрация x мкМ для раствора испытуемого соединения и y мкМ концентрация для раствора DETA-NO раствор; где x представляет собой одну из следующих конечных концентраций: 30000, 7500, 1875, 468,8, 117,2, 29,29, 7,320, 1,830, 0,460, 0,114 и 0,029 нМ, и y представляет собой одну из следующих конечных концентраций: 30, 10, 3,33, 1,11 и 0 мкМ).

После проведения описанного выше анализа, в табл. 2b представлены результаты, полученные для соединения I-1 с различным количеством DETA-NO в этом исследовании.

Таблица 2b. Цельноклеточная активность в GloSensor клеточном анализе, 384-луночный формат (пример 2b)

[DETA-NO]	30 мкМ	10 мкМ	3,33 мкМ	1,11 мкМ	0 мкМ
I-1 - EC <sub>50</sub>	A	B	B	B	B

Величины ферментативной активности sGC в клетках НЕК, определенные анализом GloSensor. (~) Расшифровки условных обозначений для величин ферментативной активности sGC, выраженных абсолютной величиной EC<sub>50</sub>, которую определяют, как концентрацию, при которой данное соединение вызывает 50% терапевтического эффекта контрольного образца с высокой активностью (соединение Y) после нормализации данных: Abs EC<sub>50</sub> ≤ 100 нМ=A; 100 нМ < Abs EC<sub>50</sub> ≤ 1000 нМ=B; 1000 нМ < Abs EC<sub>50</sub>=C. Соединения, которые были неспособны обеспечивать 50% минимального терапевтического эффекта, регистрируются как > 30 мкМ или ND.

Как показано в табл. 2b, соединение I-1 проявляет синергетическое действие в сочетании с NO при стимуляции sGC.

Пример 3. Определение биологической активности методом анализа cGMP в нейронных клетках

Из эмбрионов самок крыс линии Sprague-Dawley на 18 дне беременности извлекали первичные нейроны. Эмбрионы собирали в сбалансированном солевом растворе Хенкса (HBSS), и быстро извлекали из них головной мозг. Выделяли церебральные гиппокампы и механически их измельчали. Затем проводили расщепление ткани с помощью 0,25% (масса/объем) раствор трипсина в HBSS без Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> в течение 15 мин при 37°C. После трипсинации, клетки промывали и ресуспендировали в нейробазальной среде, дополненной 0,5 мМ L-глутамин, 12,5 мкМ глутаминовой кислоты, 2% B-27 и 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки высевали при плотности 4×10<sup>4</sup> клеток/луночка в 384-луночном планшете с плоским белым дном с нанесенным слоем поли-D-лизина (Corning Cat No 35661). Клетки инкубировали 6-7 дней при 37°C в увлажненной камере с 5% CO<sub>2</sub>. Среда удаляли, и клетки промывали 1X с помощью HBSS, содержащего Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>, и заменяли на 40 мкл HBSS, содержащего 0,5 мМ IBMX, и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Добавляли 10 мкл 5X исходного раствора испытуемых соединений с диэтилентриамин NONOate (DETA-NO). Конечная концентрация DETA-NO составляла 30 мкМ. Клетки инкубировали в течение 20 мин при 37°C. Среда удаляли, добавляли 50 мкл охлажденной льдом 10% уксусной кислоты и инкубировали в течение 60 мин при 4°C. После центрифугирования при 4°C в течение 5 мин при 1000 × g для осаждения клеточного дебриса отсасывали надосадочную жидкость в чистый планшет и образцы анализировали на содержание cGMP. Концентрации cGMP определяли в каждом образце, используя метод жидкостная хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (LC-MS/MS).

Данные нормировали относительно контрольного образца с высокой активностью, используя следующее уравнение: 100\*(образец контрольный образец с низкой активностью)/ (контрольный образец с высокой активностью - контрольный образец с низкой активностью), где контрольный образец с низкой активностью представляет собой среднее значения для 15 образцов, обработанных с помощью 1% DMSO, и контрольный образец с высокой активностью представляет собой среднее значения для 15 образцов, обработанных с помощью 10 μM известного стимулятора sGC соединения Y. Данные аппроксимировали с помощью 4-х параметрической аппроксимирующей кривой (log(агонист) против терапевтического эффекта - кривая с переменным углом наклона), используя программное обеспечение GraphPad Prism Software v.5. Для всех соединений n=2. Абсолютную величину (Abs) EC<sub>50</sub> получали из аппроксимирующей кривой путем интерполяции, и определяли ее как концентрацию, при которой данное соединение вызывает 50% терапевтического эффекта контрольного образца с высокой активностью. Соединения, которые были неспособны обеспечивать 50% минимального терапевтического эффекта, регистрируются как >30 мкМ или ND. Для соединений, которые испытывали в двух экземплярах или для которых n выше 2, приводимый результат представляет собой среднее геометрическое значение для нескольких полученных результатов. В табл. 3 приведены результаты, полученные для выбранных соединений по настоящему изобретению в этом исследовании.

Таблица 3. Биологическая активность, определенная методом анализа сGMP в нейронных клетках (пример 3)

Соединение	Abs EC <sub>50</sub> (нМ)
I-1	A
I-14	A
I-2	A
I-3	A
I-5	A
I-12	B

Анализ сGMP в нейронных клетках. AbsEC<sub>50</sub> ≤ 100 нМ=A; 100 нМ < AbsEC<sub>50</sub> ≤ 1000 нМ=B; 1000 нМ < AbsEC<sub>50</sub>=C. Соединения, которые были неспособны обеспечивать 50% минимального терапевтического эффекта, регистрируются как > 30 мкМ или ND.

Пример 4. Исследование фармакокинетических свойств соединений в спинномозговой жидкости (CSF) крысы

Протокол. Фармакокинетику (ПК) на крысах изучали после перорального дозирования. Для экспериментов по пероральному (РО) дозированию, использовали группу из 6 самцов крыс линии Sprague-Dawley с постоянным катетером, установленным в мозжечково-мозговой цистерне. Группе крыс вводили перорально дозу 10 мг/кг или 1 мг/кг соединения, приготовленную в виде раствора в PEG400. Пероральные дозы вводили путем перорального принудительного введения и доставляли дозы в желудок, используя шприц и трубку для принудительного введения. После введения пероральной дозы, трубку для принудительного введения промывали с помощью приблизительно 0,5 мл воды для обеспечения полного доставки всей дозы.

Образцы плазмы собирали следующим образом: образцы CSF и крови собирали через 1, 2 ч и, обязательно, через 4 ч после дозирования. Образцы CSF (0,05 мл) отбирали через интрацистернальный катетер. Образцы крови (0,25 мл) отбирали из ретроорбитального синуса. Эти образцы хранили на льду до тех пор, пока их не подвергали обработки для получения плазмы. Образцы крови центрифугировали при 3200 об/мин в течение 5 мин при приблизительно 5°C не позднее чем через 1 ч после отбора образцов. Плазму переносили непосредственно в 96-луночный планшет с пробирками (0,125 мл). Пробирки закрывали крышками и пробирки замораживали при приблизительно -70°C и хранили до тех пор, пока не начинали проводить анализ. Собирали плазму и анализировали ее на присутствие соединения.

#### Количественное определение соединений

Испытуемое соединение и внутренний стандарт извлекали из плазмы и CSF путем осаждения. Образцы анализировали методом жидкостной хроматографии (LC) с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (MS/MS), используя электрораспылительную ионизацию. Диапазон концентраций на стандартной кривой составлял от 1 до 1000 нг/мл. Результаты для описанных в изобретении соединений, полученные в этом исследовании, приведены в табл. 4a ниже (доза 10 мг/кг) и в табл. 4b и 4c ниже (доза 1 мг/кг).

Величина Кр<sub>иц</sub> определяется как отношение концентрации несвязанного лекарственного средства в CSF к концентрации несвязанного лекарственного средства в плазме. Несвязанное лекарственное средство в плазме (или свободную концентрацию в плазме) рассчитывают путем умножения суммарной концентрации в плазме на несвязанную долю, определяемую путем связывания с белками плазмы. Затем, для определения величины Кр<sub>иц</sub>, концентрацию в CSF делят на свободную концентрацию в плазме (смотрите, например, публикацию Di et al., J. Med. Chem., 56, 2-12 (2013)).

Таблица 4a. Фармакокинетические свойства выбранных описанных в изобретении соединений в CSF (пример 4) при дозе 10 мг/кг

Соединение	Концентрация в CSF (нМ через 1 час)	Кр <sub>иц</sub> (через 1 час)
I-1	210	0,9
I-14	284	1,7
I-2	59	0,9
I-3	6	0,8

Таблица 4b. Концентрация выбранных описанных в изобретении соединений в CSF (пример 4) при дозе 1 мг/кг

Соединение	Концентрация в CSF (нМ)		
	через в 1 час	через 2 часа	через 4 часа
I-1	21	35	39

Таблица 4с. Величина Кр,иу для выбранных описанных в изобретении соединений (пример 4) при дозе 1 мг/кг

Соединение	Кр, иу		
	через 1 час	через 2 часа	через 4 часа
I-1	1,0	1,4	1,9

Пример 5. Исследование фармакокинетических свойств соединений в спинномозговой жидкости (CSF) собаки

Протокол. Фармакокинетику (ПК) на собаках изучали после перорального дозирования. Для экспериментов по пероральному (РО) дозированию, использовали группу из 4 самцов собак породы бигль, и собакам вводили дозы 1 мг/кг соединения, приготовленные в виде суспензии в 1% НРМС Е5, 0,2% Tween 80 и 0,5% МС в воде. Пероральные дозы вводили путем перорального принудительного введения в желатиновой капсуле, и доставляли дозы в желудок, используя трубку для принудительного введения. После введения пероральной дозы трубку для принудительного введения промывали с помощью приблизительно 10 мл воды для обеспечения полной доставки всей дозы.

Образцы плазмы и CSF собирали следующим образом: образцы CSF и крови собирали через 1, 2, 4 и 8 ч после перорального дозирования. Образцы CSF (0,05 мл) отбирали из пояснично-крестцовой области (L4/5) путем прямой пункции иглой в соответствующие моменты времени. Образцы крови (0,25 мл) отбирали из головной вены. Эти образцы хранили на льду до тех пор, пока их не подвергали обработке для получения плазмы. Образцы крови центрифугировали при 3200 об/мин в течение 5 мин при приблизительно 5°C не позднее чем через 1 ч после отбора образцов. Плазму переносили непосредственно в 96-луночный планшет с пробирками (0,125 мл). Пробирки закрывали крышками и пробирки замораживали при приблизительно -70°C и хранили до тех пор, пока не начинали проводить анализ. Собирали плазму и анализировали ее на присутствие соединения.

#### Количественное определение соединений

Соединение по изобретению и внутренний стандарт извлекали из плазмы и CSF путем осаждения. Образцы анализировали методом жидкостной хроматографии (LC) с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (MS/MS), используя электрораспылительную ионизацию. Диапазон концентраций на стандартной кривой составлял от 1 до 1000 нг/мл. Результаты для описанных в изобретении соединений, полученные в этом исследовании, приведены в таблицах 5a и 5b ниже (доза 1 мг/кг).

Величина Кр,иу определяется как отношение концентрации несвязанного лекарственного средства в CSF к концентрации несвязанного лекарственного средства в плазме. Несвязанное лекарственное средство в плазме (или свободную концентрацию в плазме) рассчитывают путем умножения суммарной концентрации в плазме на несвязанную долю, определяемую путем связывания с белками плазмы. Затем, для определения величины Кр,иу, концентрацию в CSF делят на свободную концентрацию в плазме (смотрите, например, публикацию Di et al., J. Med. Chem., 56, 2-12 (2013)).

Таблица 5a. Концентрация выбранного описанного в изобретении соединения в CSF (пример 5) при дозе 1 мг/кг

Соединение	Концентрация в CSF (нМ)			
	через 1 час	через 2 часа	через 4 часа	через 8 часов
I-1	34	34	19	2,4

Таблица 5b. Величина  $K_p, u_i$  для выбранного описанного в изобретении соединения (пример 5) при дозе 1 мг/кг

Соединение	$K_p, u_i$			
	через 1 час	через 2 часа	через 4 часа	через 8 часов
I-1	0,7	0,7	0,7	0,4

Пример 6. Исследование фармакокинетических свойств соединений в спинномозговой жидкости (CSF) низшего примата (NHP)

Протокол. Фармакокинетику (PK) на низших приматах (NHP) изучали после внутривенного и перорального дозирования. Для экспериментов по внутривенному (IV) дозированию, использовали группу из 4 самцов яванских макаков. В группе животных для внутривенного (IV) дозирования вводили дозу 0,3 мг/кг соединения, приготовленную в форме раствора в 10% PEG-400, 25% раствора 20% Solutol HS 15 в воде и 65% DPBS. Внутривенные дозы вводили путем инъекции и доставлялись через катетер в головную вену. Для экспериментов по пероральному (PO) дозированию, использовали группу из 4 самцов яванских макаков. В группе животных для перорального дозирования, вводили дозы 1 мг/кг соединения, приготовленные в виде суспензии в 1% HPMC E5, 0,2% Tween 80 и 0,5% MC в воде. Пероральные дозы вводили путем перорального принудительного введения в желатиновой капсуле.

Образцы плазмы и CSF собирали следующим образом: образцы CSF и крови собирали через 1, 4 и 24 ч после внутривенного дозирования и через 2, 8 и 24 ч после перорального дозирования. Образцы CSF (0,05 мл) отбирали из мозжечково-мозговой цистерны (основное место) или из пояснично-крестцовой области (L4/5) путем прямой пункции иглой в соответствующие моменты времени. Образцы крови (0,25 мл) отбирали из периферической вены. Эти образцы хранили на льду до тех пор, пока их не подвергали обработки для получения плазмы. Образцы крови центрифугировали при 3200 об/мин в течение 5 мин при приблизительно 5°C не позднее чем через 1 ч после отбора образцов. Плазму переносили непосредственно в 96-луночный планшет с пробирками (0,125 мл). Пробирки закрывали крышками и пробирки замораживали при приблизительно -70°C и хранили до тех пор, пока не начинали проводить анализ. Собирали плазму и анализировали ее на присутствие соединения.

#### Количественное определение соединений

Соединение по изобретению и внутренний стандарт извлекали из плазмы и CSF путем осаждения. Образцы анализировали методом жидкостной хроматографии (LC) с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (MS/MS), используя электрораспылительную ионизацию. Диапазон концентраций на стандартной кривой составлял от 1 до 1000 нг/мл. Результаты для описанных в изобретении соединений, полученные в этом исследовании, приведены в таблицах 6a и 6b ниже (внутривенная доза 0,3 мг/кг, пероральная доза 1 мг/кг).

Величина  $K_p, u_i$  определяется как отношение концентрации несвязанного лекарственного средства в CSF к концентрации несвязанного лекарственного средства в плазме. Несвязанное лекарственное средство в плазме (или свободную концентрацию в плазме) рассчитывают путем умножения суммарной концентрации в плазме на несвязанную долю, определяемую путем связывания с белками плазмы. Затем, для определения величины  $K_p, u_i$ , концентрацию в CSF делят на свободную концентрацию в плазме (смотрите, например, публикацию Di et al., J. Med. Chem., 56, 2-12 (2013)).

Таблица 6a. Концентрация выбранного описанного в изобретении соединения в CSF (пример 6) при внутривенной дозе 0,3 мг/кг и при пероральной дозе 1 мг/кг

Соединение	Концентрация в CSF (нМ)					
	через 1 час, IV	через 2 часа, PO	через 4 часа, IV	через 8 часов, PO	Через 24 часа, IV	Через 24 часа, PO
I-1	27	42	20	31	6	11

Таблица 6b. Величина  $K_p, u_i$  для выбранного описанного в изобретении соединения (пример 6) при внутривенной дозе 0,3 мг/кг и при пероральной дозе 1 мг/кг

Соединение	$K_p, u_i$					
	через 1 час, IV	через 2 часа, PO	через 4 часа, IV	через 8 часов, PO	Через 24 часа, IV	Через 24 часа, PO
I-1	1,8	1,8	3,0	2,5	2,8	2,1

### Пример 7. Определение биомаркера в спинномозговой жидкости (CSF) крыс

Этот эксперимент проводили с целью определения воздействия различных доз соединения по изобретению на ответную реакцию cGMP, а также определения концентрации соединения в спинномозговой жидкости (CSF) крыс и концентрации соединения в плазме крыс.

Протокол. У каждой крысы брали пробу на анализ один раз или несколько раз с перерывом 3 или более дней между каждым дозированием.

День перед проведением эксперимента. Крысам не дают пищу в течение ночи при неограниченном доступе к воде.

День проведения эксперимента. После перорального дозирования определяли соединение и циклический гуанозинмонофосфат (cGMP) в спинномозговой жидкости (CSF) крыс. Использовали самцов крыс линии Sprague-Dawley с постоянным катетером, установленным в мозжечково-мозговой цистерне. Крысам вводили дозу 0 мг/кг (n=15), 3 мг/кг (n=19) и 10 мг/кг (n=20) соединения по изобретению, приготовленную в виде суспензии в 0,5% метилцеллюлозе, 0,5% Tween80. Пероральные дозы вводили путем перорального принудительного введения, и доставляли дозы в желудок, используя шприц и трубку для принудительного введения. После введения пероральной дозы, трубку для принудительного введения промывали с помощью приблизительно 0,5 мл воды для обеспечения полной доставки всей дозы.

Образцы плазмы и CSF собирали под анестезией изофлураном следующим образом: образцы CSF собирали через 1 и 6 ч после дозирования и образцы крови собирали через 1 ч после дозирования. Образцы CSF отбирали через интрацистернальный катетер. Отбирают приблизительно 20 мкл CSF и сбрасывают их (мертвый объем составляет 14-16 мкл); затем отбирают приблизительно 50 мкл CSF в пробирки Эппендорфа, содержащие 5 мкл ледяной уксусной кислоты. Моментально замораживают CSF путем погружения в жидкий азот. Образцы крови (0,25 мл) отбирали из ретроорбитального синуса. Эти образцы хранили на льду до тех пор, пока их не подвергали обработке для получения плазмы.

Образцы крови центрифугировали при 3200 об/мин в течение 5 мин при приблизительно 5°C не позднее чем через 1 ч после отбора образцов. Плазму переносили непосредственно в 96-луночный планшет с пробирками (0,125 мл). Пробирки закрывали крышками, и пробирки замораживали при приблизительно -70°C и хранили до тех пор, пока не начинали проводить анализ. Собирали плазму и анализировали ее на присутствие соединения.

Количественное определение соединений и cGMP. Соединение по изобретению, cGMP и внутренний стандарт извлекали из плазмы и CSF путем осаждения. Образцы анализировали методом жидкостной хроматографии (LC) с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (MS/MS), используя электрораспылительную ионизацию. Диапазон концентраций на стандартной кривой составлял от 1 до 1000 нг/мл. Результаты для описанных в изобретении соединений, полученные в этом исследовании, приведены в табл. 7 ниже (доза 3 и 10 мг/кг). Статистический анализ проводили методом анализа контрастов t-критерия Стьюдента.

Величина  $K_{p,csf}$  определяется как отношение концентрации несвязанного лекарственного средства в CSF к концентрации несвязанного лекарственного средства в плазме. Несвязанное лекарственное средство в плазме (или свободную концентрацию в плазме) рассчитывают путем умножения суммарной концентрации в плазме на несвязанную долю, определяемую путем связывания с белками плазмы. Затем, для определения величины  $K_{p,csf}$ , концентрацию в CSF делят на свободную концентрацию в плазме (смотрите, например, публикацию Di et al., J. Med. Chem., 56, 2-12 (2013)).

Таблица 7. Фармакокинетические свойства выбранных описанных в изобретении соединений в CSF (пример 7) при дозе 3 и 10 мг/кг

Соединение, доза	Концентрация в CSF (нМ через 1 час)	Концентрация в CSF (нМ через 6 часов)
I-1, 0 мг/кг	3,9	4,7
I-1, 3 мг/кг	7,2*	6,7
I-1, 10 мг/кг	14,8**	13,8*

\*  $p < \text{чем } 0,05$  относительно плацебо;

\*\*  $p < \text{чем } 0,01$  относительно плацебо

Выводы. Введение крысам однократной пероральной дозы 3 мг/кг соединения I-1 приводило к значительному повышению концентрации cGMP в спинномозговой жидкости (CSF) крыс через 1 ч после дозирования. Введение крысам однократной пероральной дозы 10 мг/кг соединения I-1 приводило к значительному повышению концентрации cGMP в спинномозговой жидкости (CSF) крыс через 1 ч и через 6 ч после дозирования.

Пример 8. Оценка действия соединений по настоящему изобретению при нарушениях синаптической передачи и пластичности в гиппокампальных срезах мышей R6/2

Считается, что улучшения синаптической передачи и пластичности, измеренные путем долговременной потенциации (LTP), указывают на способность соединения улучшать память. Долговременная потенциация (LTP) представляет собой электрофизиологическое явление, которое обычно относят к кле-

точному явлению, стимулирующему обучение и память.

Протокол.

Приготовление тонких мышинных гиппокампальных срезов.

Эксперименты проводили с мышами R6/2 и немутантными (WT) мышами в возрасте 11-12 недель, поставленных фирмой Jackson Laboratory (USA). Гиппокампальные срезы (толщиной 350 мкм) получали с помощью прибора для получения срезов тканей MacIswain в охлаждаемом льдом насыщенном кислородом растворе сахарозы (сахароза 250 мМ, глюкоза 11 мМ, NaHCO<sub>3</sub> 26 мМ, KCl 2 мМ, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 мМ, MgCl<sub>2</sub> 7 мМ и CaCl<sub>2</sub> 0,5 мМ). Срезы инкубировали 1 ч при комнатной температуре в оксигенированной искусственной спинномозговой жидкости (ACSF) следующего состава: глюкоза 11 мМ, NaHCO<sub>3</sub> 25 мМ, NaCl 126 мМ, KCl 3,5 мМ, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 мМ, MgCl<sub>2</sub> 1,3 мМ и CaCl<sub>2</sub> 2 мМ. Затем срезам давали возможность достичь исходного состояния в течение по меньшей мере 1 ч.

Перфузия среза и контроль температуры.

В ходе экспериментов срезы непрерывно перфузировали с помощью ACSF (барботировали с 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>) со скоростью 3 мл/мин с помощью перистальтического насоса (объем камеры главного электронного блока (МЕА): ~1 мл). Полная замена раствора в камере МЕА достигалась через 20 с после смены растворов. Перфузионную жидкость предварительно непрерывно нагревали при 37°C непосредственно перед достижением камеры МЕА с помощью подогреваемого перфузионного катетера (PH01, Multichannel Systems, Reutlingen, Germany). Температуру камеры МЕА поддерживали на уровне 37 ± 0,1°C с помощью нагревательного элемента, расположенного в головной части усилителя МЕА.

#### Протоколы стимуляции/применения соединения

Кривая входящего/исходящего (I/O) сигнала: от 100 до 800 мкА, с шагом 100 мкА. Затем устанавливали интенсивность стимула на фиксированную величину 250 мкА для измерений кратковременной и долговременной синаптической пластичности.

Свойства кратковременной пластичности: применяли два импульса с уменьшающимся интервалом между стимулами (например, 300, 200, 100, 50, 25 мс).

Применение соединения:

Регистрировали полевой возбуждающий постсинаптический потенциал (fEPSP) в течение 10 мин при контрольных условиях (для проверки стабильности фона), затем подвергали воздействию соединения в течение 15 мин (или воздействию только плацебо в течение 25 мин в случае контрольных срезов). Применяли описанные выше второй I/O протокол и протокол парного импульса при непрерывном присутствии соединения.

Долговременная потенциация синаптической передачи (LTP): после контрольного периода в течение 10 мин (в присутствии соединения или плацебо в случае контрольных срезов), индуцировали LTP с помощью 10X TBS. Затем проводили мониторинг потенциации синаптической передачи в течение еще 60 мин (при непрерывном присутствии соединения или плацебо в случае контрольных срезов).

#### Результаты

Сравнение между R6/2 мышами и WT мышами.

I/O характеристики были значительно выше в случае гиппокампальных срезов R6/2 мышей по сравнению с их однопометными WT мышами для более высоких интенсивностей стимуляции (700 и 800 мкА). Свойства при парном импульсе находились в одном и том же диапазоне для гиппокампальных срезов как в случае R6/2 мышей, так и в случае WT мышей, за исключением интервала между стимулами 25 мс, для которого фасилитация была значительно большей в случае R6/2 мышей. Долговременная потенциация синаптической передачи значимо нарушалась (значение  $p < 0,0001$ , двухфакторный дисперсионный анализ) в гиппокампальных срезах R6/2 мышей по сравнению с сопоставимыми по возрасту WT мышами.

Оценка 7 нМ соединения I-1.

I/O характеристики не изменялись значительно после воздействия 7 нМ соединения I-1 в R6/2 гиппокампальных срезах для всех интенсивностей стимула. Свойства при парном импульсе находились в одном и том же диапазоне для гиппокампальных срезах R6/2 мышей до и после воздействия 7 нМ соединения I-1 и значительно не отличались для любого из интервалов между стимулами (ISI). Воздействие 7 нМ соединения I-1 в течение 15 минут не изменяло амплитуду полевого возбуждающего постсинаптического потенциала (fEPSP).

В гиппокампальных срезах WT мышей (контрольные условия), высокочастотная стимуляция (HFS) инициировала потенциацию амплитуды вызванной ответной реакции, которая стабилизировалась около 45% (fEPSP увеличивалась на 46±5% в конечной точке). В гиппокампальных срезах R6/2 мышей (контрольные условия), высокочастотная стимуляция (HFS) инициировала потенциацию амплитуды вызванной ответной реакции, которая стабилизировалась около 15% (fEPSP увеличивалась на 16±3% в конечной точке). После воздействия 7 нМ соединения I-1, высокочастотная стимуляция (HFS) инициировала потенциацию амплитуды вызванной ответной реакции, которая стабилизировалась около 25% (fEPSP увеличивалась на 26±6% в конечной точке). Потенциация, наблюдаемая после воздействия 7 нМ соединения I-1, не отличалась значительно от потенциации, регистрируемой в контрольных срезах R6/2 мы-



шей (значение  $p=0,0842$ , двухфакторный дисперсионный анализ) (фиг. 1).

Оценка 46 нМ соединения I-1.

I/O характеристики были одинаковыми до и после воздействия 46 нМ соединения I-1 в R6/2 гиппокампальных срезах для всех интенсивностей стимула. Свойства при парном импульсе не повышались значительно после воздействия 46 нМ соединения I-1 для гиппокампальных срезах R6/2 мышей для всех интервалов между стимулами (ISI). Воздействие 46 нМ соединения I-1 в течение 15 минут не изменяло амплитуду fEPSP по сравнению с контрольными срезами.

В гиппокампальных срезах WT мышей (контрольные условия) высокочастотная стимуляция (HFS) инициировала потенциацию амплитуды вызванной ответной реакции, которая стабилизировалась около 45% (fEPSP увеличивалась на  $46\pm 5\%$  в конечной точке). В гиппокампальных срезах R6/2 мышей (контрольные условия), высокочастотная стимуляция (HFS) инициировала потенциацию амплитуды вызванной ответной реакции, которая стабилизировалась около 15% (fEPSP увеличивалась на  $16\pm 3\%$  в конечной точке). После воздействия 46 нМ соединения I-1, высокочастотная стимуляция (HFS) инициировала потенциацию амплитуды вызванной ответной реакции, которая стабилизировалась около 45% (fEPSP увеличивалась на  $44\pm 12\%$  в конечной точке). Потенциация, наблюдаемая после воздействия 46 нМ соединения I-1 была значимо большей, чем потенциация, регистрируемая в контрольных R6/2 срезах (значение  $p=0,0065$ , двухфакторный дисперсионный анализ) (фиг. 2).

Оценка 308 нМ соединения I-1.

I/O характеристики, регистрируемые для R6/2 гиппокампальных срезов, не повышались значительно после воздействия 308 нМ соединения I-1 для всех интенсивностей стимула. Свойства при парном импульсе были значительно ниже после воздействия 308 нМ соединения I-1 только при интервале между стимулами (ISI) 50 миллисекунд для гиппокампальных срезах R6/2 мышей. Амплитуда fEPSP слегка увеличивалась после воздействия 308 нМ соединения I-1 в течение 15- минут по сравнению с R6/2 контрольными срезами.

В гиппокампальных срезах WT мышей (контрольные условия), высокочастотная стимуляция (HFS) инициировала потенциацию амплитуды вызванной ответной реакции, которая стабилизировалась около 45% (fEPSP увеличивалась на  $46\pm 5\%$  в конечной точке). В гиппокампальных срезах R6/2 мышей (контрольные условия), высокочастотная стимуляция (HFS) инициировала потенциацию амплитуды вызванной ответной реакции, которая стабилизировалась около 15% (fEPSP увеличивалась на  $16\pm 3\%$  в конечной точке). После воздействия 308 нМ соединения I-1, высокочастотная стимуляция (HFS) инициировала потенциацию амплитуды вызванной ответной реакции, которая стабилизировалась около 35% (fEPSP увеличивалась на  $37\pm 9\%$  в конечной точке). Потенциация, наблюдаемая после воздействия 308 нМ соединения I-1 была значимо большей, чем потенциация, регистрируемая в контрольных R6/2 срезах (значение  $p=0,0059$ , двухфакторный дисперсионный анализ) (фиг. 3).

Выводы.

Несмотря на то, что самая высокая исследуемая концентрация соединения I-1 (308 нМ) слегка увеличивала амплитуду вызванной ответной реакции, ни одна из 3 концентраций не продемонстрировала значительного воздействия на общие I/O характеристики для гиппокампальных срезов R6/2 мышей. Ни одна из исследуемых концентраций соединения I-1 (7, 46 или 308 нМ) не продемонстрировала значительного воздействия на свойства краткосрочной пластичности, измеряемые с помощью парных импульсов с интервалами между стимулами (ISI) от 25 до 300 мс (за исключением 308 нМ соединения I-1, которое значительно уменьшало фасилитацию парных импульсов, применяемых с интервалом между стимулами (ISI) 50 мс). В то время как соединение I-1 с концентрацией 7 нМ не было в состоянии существенно восстановить нарушение долговременной потенциации синаптической передачи (LTP), регистрируемой для гиппокампальных срезов R6/2 мышей, это соединение полностью восстанавливало нарушение долговременной потенциации синаптической передачи (LTP) при концентрациях 46 и 308 нМ.

Пример 9. Циклический гуанозинмонофосфат (сGMP), индуцируемый соединением в головном мозге мыши

Цель. Определение воздействия различных доз соединения по изобретению на ответную реакция сGMP и определение концентрации соединения в различных областях головного мозга мыши (кортикальном слое, гиппокампе, мозжечке и стриатуме) и концентрации соединения в крови.

Протокол.

Мышам ( $n=7-8$  на каждое экспериментальное условие) вводили перорально среду-носитель (плацебо) (1% гидроксипропилметилцеллюлозы, 0,2% Tween80, 0,5% метилцеллюлозы) или 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг соединения I-1, приготовленного в среде-носителе. Через 30 мин после дозирования под анестезией изофлураном мышь обезглавливали и мозг удаляли и помещали в охлаждаемую льдом чашку Петри, содержащую жидкий раствор для диссекции (насыщенный смесью 95%  $O_2$  и 5%  $CO_2$ ). Используя охлаждаемую льдом палочку, на мозг мыши наносили фронтальную разметку с интервалом через 1 мм для разрезания на ломтики, как схематически показано ниже (не в масштабе, просто в качестве схемы).



Разрезанный на ломтики мозг переносили обратно в чашку Петри, содержащую жидкий раствор для диссекции с изобутилметилксантином 0,5 мМ (насыщенный смесью 95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>). Первым иссекают задний стриатум, вторым иссекают гиппокамп, третьим иссекают префронтальную кору головного мозга и, наконец, четвертым иссекают мозжечок. После иссечения каждой области, иссеченную ткань немедленно помещали в пробирку Эппендорфа, которая перед этим хранилась в течение 30 мин на сухом льду. Маленькие кусочки ткани очень быстро замораживали приблизительно в течение 10 с. После того, как все области были помещены в пробирки Эппендорфа, эти пробирки затем быстро замораживали путем погружения в жидкий азот. Собирали образцы цельной крови из стволовой области, используя наконечники с колпачком. Образцы тканей хранили при -80°C, а наконечники с колпачком при комнатной температуре. Уровни cGMP и соединения в головном мозге и в крови определяли методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (LC/MS); количественное содержание белка в образцах мозга определяли, используя набор для анализа белка с помощью бицинониновой кислоты (BCA protein assay kit).

Вывод. Разовая пероральная доза 10 мг/кг соединения I-1 индуцирует у мышей значительное повышение уровня cGMP во всех исследованных областях головного мозга мыши (кортикальном слое, гиппокампе, мозжечке и стриатуме) (таблицы 9a-d).

Таблица 9a. Концентрация cGMP в гиппокампе мыши, нормализованная к концентрации белка в образцах.

ГИППОКАМП нМ cGMP/мкг белка				
Плацебо	0,3 мг/кг I-1	1 мг/кг I-1	3 мг/кг I-1	10 мг/кг I-1
0,035359286	0,042545857	0,04302025	0,051901286	0,117125**

\*\* p < чем 0,01 относительно плацебо

Таблица 9b. Концентрация cGMP в стриатуме мыши, нормализованная к концентрации белка в образцах

СТРИАТУМ нМ cGMP/мкг белка				
Плацебо	0,3 мг/кг I-1	1 мг/кг I-1	3 мг/кг I-1	10 мг/кг I-1
0,02185575	0,022608143	0,031235625	0,037185875	0,046120125*

\* p < чем 0,05 относительно плацебо

Таблица 9c. Концентрация cGMP в мозжечке мыши, нормализованная к концентрации белка в образцах

МОЗЖЕЧОК нМ cGMP/мкг белка				
Плацебо	0,3 мг/кг I-1	1 мг/кг I-1	3 мг/кг I-1	10 мг/кг I-1
0,473119429	0,319919286	0,457655	0,75244675	1,7957685****

\*\*\*\* p < или=0,0001 относительно плацебо

Таблица 9d. Концентрация cGMP в кортикальном слое мыши, нормализованная к концентрации белка в образцах

КОРТИКАЛЬНЫЙ СЛОЙ нМ cGMP/мкг белка				
Плацебо	0,3 мг/кг I-1	1 мг/кг I-1	3 мг/кг I-1	10 мг/кг I-1
0,06765825	0,077611714	0,08063575	0,10810275	0,173364125*

\* p < чем 0,05 относительно плацебо

Пример 10. Тест на распознавание нового объекта (NOR)

Цель. Оценка эффективности соединений по настоящему

изобретению по улучшению состояния при нарушении памяти, вызванном МК-801, путем использования теста на распознавание нового объекта (NOR) у самцов крыс линии Long Evans. NOR является тестом на распознавание объекта в результате использования животным информации, полученной в результате обучения или находящейся в памяти, который основан на спонтанном предпочтении грызунов исследовать новый объект по сравнению со знакомым объектом (Ennaceur and Delacour, 1988). Исследо-

вания показали, что методика NOR задействует различные области мозга, включающие околоносовой кортикальный слой (Ennaceur et al. 1996, 1997 and Aggleton et al. 1997) и гиппокамп (Wood et al. 1993 and Clark et al. 2000). Тест NOR уже давно широко используется для оценки исследуемых новых соединений, потенциально усиливающих когнитивную функцию. В силу того, что модель NOR не подразумевает использование поощрительных или болевых стимулов, она дает меньше искажающих факторов при преобразовании ее в аналогичные тесты, проводимые при клинических испытаниях на людях. В настоящем исследовании, модель сохранения памяти использовали для тестирования нового соединения -- МК-801 (дизоцилпина), неконкурентного антагониста NMDA рецептора, который использовали для инициирования дефицита опознающей памяти. Соединения по настоящему изобретению оценивали по их эффективности восстанавливать память при ее нарушении.

#### Материалы и методы

**Животные.** В этом исследовании использовали взрослых самцов крыс линии Long-Evans (массой 275-299 грамм, поставленных фирмой Envigo, Indianapolis, IN). Крыс помещали в экспериментальные комнаты и присваивали им уникальные номера идентификации (маркировки на хвосте). Крыс размещали по 2 особи в клетке в поликарбонатных клетках с фильтрующим верхом и давали возможность акклиматизироваться в течение по меньшей мере 7 дней перед тестированием. В клетке для животного поддерживали цикл дня и ночи 12/12 ч (свет включали в 07,00 по восточному стандартному поясному времени), температуру  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  и относительную влажность приблизительно 50%. Корм и воду предоставляли без ограничения. Всех животных подвергали медицинскому осмотру, контролировали и взвешивали перед исследованием, для того чтобы гарантировать их соответствующее состояние здоровья и минимизировать неспецифический стресс, связанный с тестированием. Каждое животное случайным образом распределялось в ту или иную группу, подвергаемую обработке. Эксперименты проводили во время фазы дневного цикла для животного.

**Испытуемые соединения.**

В этом исследовании использовали следующие соединения:

МК-801 (0,1 мг/кг; Sigma-Aldrich) растворяли в физиологическом растворе и инъецировали интраперитонеально за 15 мин перед началом тренировки NOR.

Галантамин (1 мг/кг; Tocris) растворяли в физиологическом растворе и инъецировали интраперитонеально за 15 мин перед началом тренировки.

Соединение I-1 (0,01, 0,1 и 1 мг/кг) перорально вводили за 60 мин до тренировки. Объемная доза составляла 4 мл/кг.

**Экспериментальные методики.** Тест NOR проводили на арене с открытым пространством (40×40 см), помещенной в звуконепропускаемую комнату с приглушенным освещением. Каждую крысу подвергали тестированию отдельно, и предпринимались меры для удаления запахов/вкусовых раздражителей путем очистки арены и тестируемых объектов с помощью 70% спирта между экспериментами и крысами. Все эксперименты по тренировке и тестированию записывали на видеопленку и оценивались наблюдателем, который не был посвящен в проводимые над крысами обработки.

В дни 1 и 2 крысам позволяли свободно исследовать арену (при отсутствии на ней объектов) в течение 5-минутного периода привыкания. На день 3 (день тренировки и тестирования) крысам вводили плацебо (физиологический раствор), растворы галантамина или соединения, затем МК-801 или плацебо (физиологический раствор). После периода времени предварительной обработки каждое животное помещали на арену для тестирования, на которой присутствовали два одинаковых объекта. Каждую крысу помещали на арену с обращенной мордочкой в одном и том же направлении в одну и ту же позицию и регистрировали время, затраченное на активное исследование объектов в течение 3-минутного периода тренировки (T1). После тренировки крыс возвращали в их клетки. Тест NOR (T2) проводили через 1 ч после T1. Каждую крысу помещали обратно помещали на арену для тестирования в присутствии одного знакомого объекта и одного нового объекта на время 5 мин и регистрировали время, затраченное на исследование обоих объектов в течение промежутков времени 0-1, 0-3 и 0-5 мин. Порядок демонстрации и положение объектов (лево/право) при T2 рандомизировали между крысами для предотвращения появления у них предпочтения определенному порядку или месту расположения объектов.

**Статистический анализ.**

Данные теста NOR (T2) выражали через коэффициент предпочтения, который определяют, как отношение времени, затраченного на исследование нового объекта, к суммарному времени, затраченному на исследование обоих объектов (новый объект/(знакомый объект+новый объект) × 100%) во время проведения теста. Данные анализировали путем использования однофакторного дисперсионного анализа, затем путем использования апостериорного теста Фишера на минимальное значимое различие раздельно в диапазоне времени 0-1, 0-3 и 0-5 мин при значимости, установленной при  $P < 0,05$ . Животные с суммарным временем исследования объекта меньшим чем 10 с в течение 5 минутной сессии тестирования из статистического анализа исключали; крысы с коэффициентом предпочтения выше 90% или ниже 30% также исключались из статистического анализа, так как они предполагали наличие сильной (не основанной на памяти) взаимной связи двумя объектами. И затем статистически резко отклоняющиеся значения,

которые были выше или ниже на два средних квадратичных отклонений от среднего значения, удаляли из окончательного анализа. При этих критериях 1-3 крысы были исключены из каждой экспериментальной группы (N=15~16) и исключены из статистических анализов для всего временного диапазона (0-1, 0-3 и 0-5 мин).

Результаты.

Ни одной из крыс в этом исследовании не было обнаружено проявления выраженных побочных явлений при любой дозе. Крысы сохраняли нормальный тонус центральной нервной системы, активность и уровень интереса к объектам. Дисперсионный анализ показал значимые основные воздействия обработки на коэффициент предпочтения в процессе временного диапазона 0-1 мин [ $F(8,121)=2,451$ ,  $P<0,05$ ]. Апостериорный тест показал, что МК-801 0,1 мг/кг вызывает сильное нарушение памяти, при этом коэффициент предпочтения достигает уровня случайности (50%). Галантамин (1 мг/кг) и соединение I-1 при 1 мг/кг значимо восстанавливает индуцированные с помощью МК-801 нарушения памяти ( $P_s<0,01$  и  $P_s<0,05$  соответственно, относительно группы, обработанной плацебо/МК-801). В течение временного диапазона 0-3 мин (табл. 10) дисперсионный анализ обнаружил значимый основной эффект обработки [ $F(8,121)=3,404$ ,  $P<0,01$ ].

Апостериорный тест показал, что МК-801 0,1 мг/кг вызывал сильное нарушение памяти, при этом индекс предпочтения достигает уровня случайности (50%). Галантамин (1 мг/кг) и соединение I-1 при 0,1 и 1 мг/кг значимо восстанавливали индуцированные с помощью МК-801 нарушения памяти ( $P_s<0,001$ ,  $P_s<0,01$  и  $P<0,05$  соответственно относительно группы, обработанной плацебо/МК-801). Аналогично, дисперсионный анализ показал значимое основное воздействие обработки на коэффициент предпочтения в процессе временного диапазона 0-5 мин [ $F(8,121)=3,179$ ,  $P<0,01$ ]. Апостериорный тест показал, что МК-801 при 0,1 мг/кг вызывал сильное нарушение памяти, при этом индекс предпочтения достигает уровня случайности (50%). Галантамин (1 мг/кг) и соединение I-1 при 1 мг/кг значимо восстанавливали индуцированные с помощью МК-801 нарушения памяти ( $P<0,001$ ,  $P<0,01$  и  $P_s<0,05$ , соответственно, относительно группы, обработанной плацебо/МК-801).

Таблица 10. Данные по определению коэффициента предпочтения (временной диапазон 0 и 3 мин)

Обработка	n число	Среднее значение	Стандартное отклонение	Стандартная ошибка среднего значения	Статистический анализ (p- значение)
Контроль плацебо + физиологи- ческий раствор	13	72,4	6,8	1,9	<0,001
Плацебо + МК-801	12	54,1	7,8	2,3	NA
Галантами- н + МК-801	14	66,2	9,3	2,5	0,002
I-1 (0,1 мг/кг) + МК-801	13	60,1	10,0	2,8	0,133
I-1 (1 мг/кг) + МК-801	16	64,8	12,0	3,0	0,005
I-1 (10 мг/кг) + МК-801	15	66,8	9,5	2,5	0,001

Статистические сравнения выполнены относительно группы с обработкой "плацебо+МК-801".

Статистическая значимость подразумевает значение p меньше чем 0,005.

Выводы. Эталонное соединение галантамин 1 мг/кг значимо восстанавливал когнитивное наруше-

ние, индуцированное с помощью МК-801 0,1 мг/кг, что позволяет сделать вывод о достоверности результатов, полученных при проведении теста. Соединение I-1 при 0,1 мг/кг и 1 мг/кг продемонстрировало явную эффективность при сохранении памяти в тесте на распознавание нового объекта (NOR) после обработки с помощью МК-801, что позволяет сделать вывод о том, что соединение обладает свойствами по улучшению памяти.

Пример 11. Активация головного мозга у крыс, измеряемая методом fMRI-BOLD

Цель.

Функциональная магнитно-резонансная томография или функциональная MRI (fMRI) является методом функциональной нейровизуализации, использующим технологию MRI, который позволяет измерять активность головного мозга путем детектирования изменений, связанных с током крови. Этот метод основывается на том факте, что церебральный ток крови и нейронная активация взаимосвязаны. Когда используется область мозга, ток крови к этой области также увеличивается. Бодрствующих крыс исследовали методом fMRI с целью оценки изменений ("характерного признака") активности мозга после однократного внутривенного введения соединения по изобретению.

Схема проведения эксперимента.

Использовали 24 самца крыс линии Sprague-Dawley с массой от 275-350 г. После акклиматизации животных помещали в приспособление для фиксации и устанавливали внутри магнита. Каждому животному устанавливали катетеры, позволявшие дистанционно осуществлять дозирование при нахождении животных внутри магнита. Сканы непрерывно регистрировались в течение 5 минут перед введением или плацебо, или соединения по изобретению, с целью установления исходной величины активности головного мозга. После 5-минутного периода установления исходной величины активности головного мозга, крысе вводили или плацебо или соединение по изобретению и непрерывно регистрировали сканы f в течение 30-45 мин.

План исследования.

Группа №	N	Обработка	Доза (мг/кг)	ROA	Визуализация
1	10	Плацебо	--	IV и EC <sub>50</sub>	Изображения регистрировал и непрерывно, начиная за 5 минут до дозирования и
2	10	I-1	Определяется по величине EC <sub>50</sub>		
3	10	Соединение, стимулятор sGC, не проникающее в центральную нервную систему (CNS)	Определяется по целевой величине кровяного давления (BP) в результате ответной реакции		

Результаты.

Как показано на фиг. 4, более обширная область мозга активируется при введении животному соединения по изобретению (соединения I-1) (фиг. 4, справа), чем в случае, когда животному вводят стимулятор sGC, действие которого ограничивается периферией (то есть, соединение, которое не проникает в CNS) (фиг. 4, слева). В частности, при введении соединения по изобретению, активировались области головного мозга, связанные с памятью (переходные области коры головного мозга, таламус и вентральный гиппокамп) и возбуждением (ретикулярной активирующей системы).

Пример 12. Фосфорилирование pCREB в первичных нейронах крысы

Цель.

Оценка способности соединения I-1 активировать белок, связывающий с cAMP-чувствительный элемент (CREB), в первичных нейронах крысы. CREB представляет собой фактор транскрипции клеток. Он связывает последовательности ДНК, называемые cAMP-чувствительными элементами (CRE), и регулирует транскрипцию генов, регулирующих последующие звенья сигнальных каскадов (см. публикацию Bourtchuladze R, et al., Cell 1994; 79 (1): 59-68). CREB играет убедительно подтвержденную документаль-

ными доказательствами роль в нейрональной пластичности и формировании долговременной памяти в мозге, и, как было показано, он является неотъемлемой частью при формировании пространственной памяти (см. публикацию Silva AJ, et al., Annual Review of Neuroscience 1998; 21: 127-148). Белки CREB активируются в результате фосфорилирования серина 133 различными киназами, включающими сАМР-зависимую протеинкиназу или протеинкиназу А (PKA), сGMP-зависимую протеинкиназу или протеинкиназу G (PKG) и  $Ca^{2+}$ /кальмодулин-зависимые протеинкиназы. (смотрите публикации Shaywitz AJ and Greenberg ME, Annual Review of Biochemistry 1999; 68 (1): 821-861 and Wong JC, et al., J Cell Biochem 2012; 113(11): 3587-98). Стимуляция CREB могла бы давать положительные терапевтические результаты в случае заболеваний, при которых нарушаются когнитивная деятельность, нейрональная пластичность и/или нейрональная функция.

#### Материалы и методы

**Соединения.** Соединение I-1 растворяли в DMSO с получением 10 мМ раствора и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для получения требуемых испытуемых концентраций исходные концентрации последовательно разбавляли в DMSO и затем разбавляли до соответствующей концентрации в буфере для анализа.

**Культирование первичных нейронов крысы.** Нейроны выделяли из эмбрионов крысы линии Sprague Dawley на 18-ом дне беременности 18 (E18). От каждой крысы получали приблизительно 10 эмбрионов, и из эмбрионов выделяли цельный мозг. Из мозга иссекали гиппокамп и кортекс под контролем стереоскопического микроскопа, используя две пары тонких микропинцетов. Осторожно удаляли мягкие мозговые оболочки. После диссекции, ткани измельчали и аккуратно промывали один раз с помощью 10 мл не содержащего  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  раствора Хенкса (HBSS, Corning cat #21-022-CM) в конической пробирке объемом 15 мл. После промывки к тканям в пробирке добавляли 5 мл раствора 0,25% трипсина (Invitrogen cat #15090-046) и 0,1% дезоксирибонуклеазы I (DNase I, Sigma cat #DN-25) и затем инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 15 мин. После инкубации и расщепления с помощью ферментов ткани промывали три раза охлажденным льдом HBSS. После промывки в пробирку добавляли 3 мл раствора 0,1% DNase I и ткани медленно отбирали пипеткой, используя стеклянную пипетку Пастера, 12 раз, и затем центрифугировали при  $500 \times g$  в течение 10 мин. Осадок клеток ресуспендировали в культуральной среде (Neurobasal medium, Gibco cat #21103-049) с добавкой 2% B27 (Gibco Cat #17504-044), 0,5 мМ L-глутамин (Corning cat #25-005-CI), 25 мкМ L-глутаминовой кислоты (Sigma cat #G1251) и 1% пенициллин/стрептомицин (Gibco cat #15070-063)). Затем суспензию клеток высевали в 96-луночных планшетах с нанесенным покрытием из поли-L-лизина с плотностью 100000 клеток/луночка. Через 24 ч после посева половину культуральной среды удаляли и заменяли на описанную выше культуральную среду, но без глутаминовой кислоты. Клетки выдерживали при  $37^{\circ}\text{C}$  в увлажняемом инкубаторе с 5%  $\text{CO}_2$  и использовали в течение 6-10 дней.

**Условия проведения анализа.**

Для каждой испытуемой концентрации, соединение I-1 разбавляли в 100% DMSO в 100 раз до его конечной концентрации. Немедленно перед проведением анализа соединение I-1 разбавляли в 10 раз в HBSS (содержащим кальций и магний) (10x конечная концентрация для анализа) содержащим 100 мкМ DETA-NONOate (10x конечная концентрация для анализа). Среду удаляли и клетки промывали один раз с помощью 90 мкл HBSS (Corning cat # 21-023-CV). Клетки затем инкубировали с 90 мкл HBSS в течение 30 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ . К клеткам добавляли 10 мкл из планшета с испытуемым соединением/HBSS/DETA-NONOate, которые инкубировали в течение еще 30 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ . Конечные концентрации DMSO составляли 1%, конечная концентрация DETA-NONOate составляла 10 мкМ и конечные концентрации соединения I-1 составляли 10000, 1000, 100, 10, 1, 0,1, 0,01 и 0,0 нМ. Среду удаляли, и клетки лизировали, и проводили анализ в соответствии с протоколом Cisbio (phospho-CREB (Ser133) catalog # 64CREPEG), и планшет считывали с помощью планшет-ридера Envision (PerkinElmer).

**Анализ данных.**

Данные анализировали путем аппроксимации 4-параметрической кривой ( $\log(\text{агонист})$  относительно ответной реакции - с изменяющимся углом наклона), используя программное обеспечение GraphPad Prism Software v.7. Величину  $\text{EC}_{50}$  получали интерполированием из аппроксимационной кривой и определяли ее как концентрацию, при которой соединение I-1 вызывает 50% максимальной ответной реакции.

**Результаты.**

Фосфорилирование CREB при Ser133, стимулированное соединением I-1, зависело от концентрации, при этом величина  $\text{EC}_{50}$  составляла 3,0 нМ. Интервал с 95% достоверностью составлял от 0,5 до 17,8 нМ.

**Пример 13.** Оценка соединений по настоящему изобретению при испытаниях с использованием экспериментальных моделей боли

**Цель.** Оценка эффективности действия соединений по настоящему изобретению при острой и тонической боли, воспалительной боли, послеоперационной боли и висцеральной боли.

**Материалы и методы:** острая и тоническая боль

**Тест давления на лапу.** Определяют статическую механическую гипералгезию. Этот тест требует

приложения возрастающего давления на задние лапы между плоской поверхностью и затупленным наконечником. Для оценки обезболивающего действия соединения в одной задней лапе животного вызывали воспаление путем инъекции или повреждали ее в результате наложения лигатуры, в то время как другую заднюю лапу оставляли неповрежденной или невоспаленной. Прибор оказывал стабильно увеличивающееся усилие на задние лапы. Порог чувствительности к внешнему воздействию определяли, как давление (в граммах), требующееся для проявления эффекта отдергивания лапы и/или подачи голосового сигнала. Животных осторожно удерживали в руках экспериментатор, и статическую механическую гипералгезию оценивали два раза для обеих задних лап.

Тест на подергивание хвостом. Тепловое излучение направляли на хвост. Когда крыса чувствовала дискомфорт, она реагировала путем внезапного движения хвостом (подергивания хвостом), после чего автоматически прекращалась стимуляция и останавливался таймер для измерения времени реакции животного или латентного периода ноцицептивной реакции (периода от начала стимуляции до обнаружения ответной реакции животного). Заранее устанавливали предельное время отключения, равное 10 с, для предотвращения повреждения ткани животного.

Тест на ответную реакцию при воздействии уксусной кислоты. Вызывали абдоминальное сокращение путем интраперитонеальной инъекции крысам 0,6% раствора уксусной кислоты (10 мл/кг). Регистрировали число скорчиваний (извиваний или изгибаний тела в результате боли) в течение времени с пятой по пятнадцатую минуту после инъекции.

Тест на ответную реакцию при воздействии формалина. Инъекцировали субплантарным способом 2,5% раствор формалина в правую заднюю лапу. Проводили оценивание в баллах болевое поведение крыс в течение 36 мин через каждые 3 мин в соответствии со следующей системой балльной оценки:

0=нормальное поведение инъекцируемой задней конечности при поддержке тела

1=легкое прикосновение инъекцируемой лапы к полу для некоторой поддержки или при отсутствии поддержки тела

2=полное отдергивание инъекцируемой лапы

3=вылизывание, покусывание или встряхивание инъекцируемой лапы

Материалы и методы.

Воспалительная боль

Индукция каррагенаном. За 3 ч перед оценкой пороговой величины ноцицептивной боли путем проведения теста давления на лапу в подушечку правой задней лапы инъекцировали 100 мкл 2% суспензии каррагенана. Затем проводили тест давления на лапу, как описано выше.

Индукция каолином. У крыс индуцировали односторонний артрит путем внутрисуставной инъекции 10% суспензии каолина в коленный сустав правой задней лапы под газовой анестезией (3,5% изофлуран/3 л/мин). Оценка походки в баллах: оценка походки в баллах будет проводиться через 3 ч 30 мин после введения каолина следующим образом:

0: неизменная походка

1: небольшое затруднение

2: кратковременное поднятие вверх лапы

3: поднятая лапа

Материалы и методы.

Послеоперационная боль: модель Бреннана.

Хирургическое вмешательство: хирургическое вмешательство при газовой анестезии (3,5% изофлуран/3 л/мин).

У всех крыс обнажали подошвенный аспект левой задней лапы и с помощью лезвия скальпеля делали продольный разрез длиной 1 см через кожу и фасцию подошвенного отдела стопы, начиная с 0,5 см от проксимального края пятки и в направлении пальцев ноги. Подошвенную мышцу приподнимали и разрезали в продольном направлении, оставляя при этом прикрепление мышцы нетронутыми. После гемостаза при легком надавливании кожу зашивали путем накладывания двух швов. После операции животные восстанавливались в своих клетках.

Электронный тест фон Фрея.

Тактильную аллодинию оценивали с помощью электронного теста фон Фрея через 24 ч после хирургического вмешательства. Тест требует приложения увеличивающегося давления на подошвенный аспект задних лап. Прибор оказывал стабильно увеличивающееся усилие на задние лапы. Порог чувствительности к внешнему воздействию определяли, как давление (в граммах), требующееся для проявления эффекта отдергивания лапы. Каждое измерение порога чувствительности ответной реакции повторяли три раза для обеих задних лап с интервалами приблизительно от 2 до 3 мин.

Результаты для моделей острой и тонической боли, воспалительной боли и послеоперационной боли и тестирования животных, которым вводили перорально 10 мг/кг соединения I-1, были статистически значимыми и представлены ниже.

## Результаты.

Модель боли	Модель-тест	Соединение I-1, перорально, 10 мг/кг	Внутренний стандарт	
		% активности относительно плацебо	референтное лекарственное средство внутривенно	% активности относительно плацебо
Острая и	Здоровые	-6%	Морфин	69%
тоническая боль	крысы - тест давления на лапу		4 мг/кг подкожно	
	Здоровые крысы - тест на подергивание хвостом	25%	Морфин 4 мг/кг подкожно	66%
	Тест на уксусную кислоту - абдоминальные сокращения	7%	(-) U50, 488 H 3 мг/кг подкожно.	100%
	Тест на формалин - баллы (ранняя фаза)	57%	Морфин 4 мг/кг подкожно	57%
	Тест на формалин - баллы (поздняя фаза)	32%	Морфин 4 мг/кг подкожно	38%
Воспалительная боль	Каррагенан - тест давления на лапу	38%	Индометацин 30 мг/кг перорально	100%
	Каолин - оценка походки в баллах	40%	Индометацин 30 мг/кг перорально	58%
Послеоперационная боль	Модель Бреннана - электронный тест фон Фрея	31%	Морфин 4 мг/кг подкожно	88%

## Тестирование.

Через 120 мин после проведения обработки. N=4/модель/тест. Результаты приведены для каждой группы в виде процента активности, рассчитанного относительно средней величины для обработанных с помощью плацебо животных и сравниваемой с животными, не использовавшимися ранее в опытах, с



контрольным значением в тесте для давления на лапу или пороговым значением, в зависимости от теста.

Выводы. Соединение I-1 продемонстрировало обезболивающие эффекты в тесте с формалином для острой боли. Соединение I-1 продемонстрировало обезболивающие эффекты в моделях воспалительной боли с карагеном и каолином. Соединение I-1 продемонстрировало обезболивающие эффекты в тесте для послеоперационной боли.

Пример 14. Антигипералгезические эффекты при разовых и повторных введениях соединения I в экспериментальной модели диабетической нейропатии (модель STZ) на крысах

Цель. Оценка антигипералгезических эффектов при разовых и повторных введениях соединения по изобретению в экспериментальной модели диабетической нейропатии (модель с стрептозотоцином) на крысах использовании теста давления на лапу. Габапентин будет использоваться в качестве внутреннего препарата сравнения. Морфин-HCl будет использоваться в качестве референтного вещества для валидирования анализа.

У людей одной из главных причин нейропатической боли является диабетическая нейропатия. Известны несколько экспериментальных моделей диабета на животных, но наиболее часто используемой моделью для исследования боли является модель с стрептозотоцином. В этой экспериментальной модели, нейропатию репродуцируют у крыс, используя разовую интраперитонеальную инъекцию стрептозотоцина, который вызывает диабет и, вследствие этого, гипералгезию и аллодинию (см. публикацию Rakieten N et al., Cancer Chemother, 1963(Rep.29) :91). Через семь дней (D7) у больных диабетом животных обнаруживают значительное повышение гликемии в сочетании с потерей веса, полидипсией и полиурией. У животных развивается механическая гипералгезия, которая может быть измерена через 18 дней, используя механическую ноцицептивную стимуляцию (тест давление на лапы) (см. публикацию Randall LO and Selitto JJ, Arch Int Pharmacodyn, 1957(111):409-419).

### Материалы

#### Животные.

В день индуцирования диабета использовали семьдесят (70) самцов крыс линии Sprague-Dawley (со статусом свободных от специфической патогенной микрофлоры (SPF), Janvier, France), с массой 210-300 г. Крыс размещали в помещении с контролируемой температурой (20-24°C) и относительной влажностью (45-65%) и акклиматизировали к искусственному циклу день/ночь с 12-часовым периодом света (от 6.30 утра до 6.30 вечера)/с 12-часовым периодом темноты. Крысам обеспечивали свободный доступ к водопроводной воде и без ограничения к гранулированному полноценному корму (reference A04, S.A.F.E.). Животных размещали по 3 особи в клетке (клетки типа E) и давали возможность им акклиматизироваться в течение периода по меньшей мере 5 дней до начала проведения любого теста. Каждую крысу идентифицировали путем маркировки хвоста. Исходя из статуса SPF вивария, не было оснований ожидать, что в корме, воде или подстилке могут присутствовать посторонние примеси в таких концентрациях, которые способны исказить результаты тестов.

#### Реагенты.

Стрептозоточин (STZ, Sigma-Aldrich) приготавливали для немедленного введения в виде раствора в цитратном (тринатриевая соль лимонной кислоты, Sigma-Aldrich) буфере 1 мМ рН 4-4,5 (в воде для инъекции). 0,9% NaCl использовали в качестве среды для габапентина (Zhejiang Excel pharma Co. Ltd.), морфин-HCl (Francoria) и соединения I-1. Инсулин (Sanofi-Aventis) готовили при 10 МЕ/мл в 0,9% NaCl.

Оборудование. Глюкометр Accu-Chek® (Roche Diagnostics S.A., France) и тест-полоски Accu-Chek® (Roche Diagnostics S.A., France) использовали для измерения гликемии. Анальгезиметр Ugo Basile (Ugo Basile, Italy) будет использоваться в тесте давления на лапы.

Обработка данных. Программное обеспечение SigmaStat software version 3,5 (SPSS Science Software, Erkrath, Germany), Lab X direct software version 2,4 (Mettler Toledo, France).

#### Методы.

Болевой тест. Статическую механическую гипералгезию оценивали с помощью теста давления на лапы или теста Рэндалла и Селитто (смотрите публикацию Randall LO и Selitto JJ, Arch Int Pharmacodyn, 1957 (111): 409-419, содержание которой включено в настоящее изобретение путем ссылки на нее). Этот тест требует приложения увеличивающегося давления на задние лапы между плоской поверхностью и тупым наконечником. Этот тест обычно проводят для оценки обезболивающего действия соединений на животных с одной воспаленной задней лапой, воспаление которой обусловлено инфекцией или повреждением в результате наложения лигатуры, и с одной нормальной задней лапой. Прибор оказывает постоянно увеличивающееся физическое воздействие, и порог чувствительности к прилагаемому физическому воздействию определяется как давление (в граммах), необходимое для проявления эффекта отдергивания лапы и/или подачи голосового сигнала. В эксперименте, при оценке статической механической гипералгезии животных осторожно удерживал в руках экспериментатор. Каждый порог реакции измеряли для обеих задних лап.

Схема проведения эксперимента.

Используются семь экспериментальных групп по 10 крыс в каждой:

группа 1: животные с имитацией обработки (цитратный буфер)/плацебо, перорально, раствор, еже-

дневно со дня 18 до дня 21 (D18-D21)

группа 2: STZ (75 мг/кг, интраперитонеально)/плацебо, перорально, раствор, ежедневно от D18 до D21

группа 3: STZ (75 мг/кг, интраперитонеально)/соединение I-1 (1 мг/кг, перорально), раствор, ежедневно от D18 до D21

группа 4: STZ (75 мг/кг, интраперитонеально)/соединение I-1 (3 мг/кг, перорально), раствор, ежедневно от D18 до D21

группа 5: STZ (75 мг/кг, интраперитонеально)/соединение I-1 (10 мг/кг, перорально), раствор, ежедневно от D18 до D21

группа 6: STZ (75 мг/кг, интраперитонеально)/габапентин (100 мг/кг, перорально) в 0,9% NaCl, раствор, однократно в дни тестирования (D18 и D21)

группа 7: STZ (75 мг/кг, интраперитонеально)/морфин (4 мг/кг, подкожно) в 0,9% NaCl, раствор, однократно в дни тестирования (D18 и D21)

Плацебо, соединение I-1 вводили перорально при дозе 5 мл/кг. Габапентин вводили перорально при дозе 10 мл/кг. Морфин-НСl вводили подкожно (5 мл/кг). Дозы указаны в пересчете на свободное действующее вещество. Дозирование и тестирование проводились в случайном порядке экспериментатором, от которого были скрыты подробности эксперимента, за исключением группы животных с имитацией обработки и группы животных, подвергаемых обработке морфином.

Методика.

Индукция. Хроническую периферическую невропатию индуцировали однократной интраперитонеальной инъекцией стрептозотоцина (75 мг/кг, интраперитонеально) в день D0. В шести экспериментальных группах вводили стрептозотоцин, а в одной группе вводили цитратный буфер 1 мМ (субстрат стрептозотоцина, то есть плацебо) после измерения гликемии. В день D7, измеряли гликемию, и крысам с уровнем > 250 мг/дл вводили подкожно инсулин (Lantus®, 2 МЕ/ крыса) три раза в неделю с инъекциями каждые два дня от D7-8 до D14, на D18 в конце дня и на D20 для предотвращения чрезмерной кахексии. На D7, животных с гликемией < 250 мг/дл снова лечили стрептозотоцином (75 мг/кг, внутривенно). Гликемию измеряли на D14, и крысам с уровнем > 250 мг/дл подкожно вводили инсулин (Lantus®, 2 МЕ/крыса) три раза в неделю с инъекциями каждые два дня от D14 до D19.

Поведенческое тестирование. Отбирают животных STZ (исходный уровень) на D18 и проводят тест (дозирование животных и поведенческий тест) на D18 и D21. Последовательность действий была следующей.

В день 0 (D0), измеряли гликемию до индуцирования диабета путем инъекции стрептозотоцина (75 мг/кг, интраперитонеально) для отбора животных, соответствующих критериям включения (гликемия < 150 мг/дл).

На D7 и на D18, измеряли гликемию для отбора животных с гликемией выше 250 мг/дл (за исключением животных группы 1, в которой имитировали обработку животных).

На D18, измеряли пороги ноцицептивной реакции (подача голосового сигнала или отдергивание лапы) во всех группах для отбора страдающих диабетом животных, соответствующих критериям включения: 20 грамм < порог отдергивания лапы < 240 г. Отбирали животных, для которых имитировали обработку, с порогом отдергивания лапы для обеих задних лап от 280 до 520 г. Животных с массой тела < 200 г или > 400 г исключали из исследования.

На D18, вводят плацебо (носитель), соединение I-1, габапентин и морфин (T0). Антигипералгезический эффект плацебо, соединения I-1, габапентина и морфина оценивали на обеих задних лапах с использованием теста давления лапы через 60, 120, 180 и 240 мин после введения лекарственного средства. Животных, которым вводили морфин, также тестировали через 30 мин после введения, но эти данные не использовали, так как морфин оказывал значительный антигипералгезический эффект через 60 минут после введения.

Крыс из групп с 1 по 5 подвергали ежедневной обработке на D19, D20 и D21.

На D21, во всех группах измеряли гликемию и ноцицептивные пороги перед ежедневной обработкой. Вводили плацебо, соединение I-1, габапентин и морфин (T0). Антигипералгезический эффект морфина оценивали через 30 мин после его введения, используя тест давления на лапы, и через 120 мин после введения плацебо, соединения I-1, габапентина и морфина.

#### Представление данных и статистический анализ

Результаты представлены в следующем виде.

Порог отдергивания лапы (среднее значение ± стандартная ошибка среднего) в граммах контактного давления для каждой группы, рассчитанный по индивидуальным значениям порогов отдергивания лапы. Процент отклонения от номинальной величины порога отдергивания лапы, рассчитанный по среднему значению в группе, получавшей плацебо.

Для определения статистической значимости воздействия тестируемого вещества (веществ) и референтного вещества, проводили анализ данных с использованием параметрического или непараметрического критерия в зависимости от нормального распределения результатов. Уровень значимости указан

ниже.

Результаты.

На D18, на момент времени 0 мин все группы, в которых крысам вводили STZ, имели гипералгезию с ноцицептивным порогом около 200 г в отличие от нормальных крыс с ноцицептивным порогом около 350 г. Через 60 мин после введения вещества (то есть, плацебо, соединения I-1 в дозе 1, 3 или 10 мг/кг, габапентина или морфина) величины ноцицептивного порога для габапентина ( $272 \pm 6,6$ ,  $p < 0,01$ ), морфина ( $420 \pm 35$ ,  $p < 0,001$ ) и соединения I-1 в дозе 10 мг/кг ( $328 \pm 32,6$ ,  $p < 0,001$ ) статистически различались, демонстрируя эффективность по сравнению с группой, получавшей только плацебо. Аналогично, через 120 мин величины ноцицептивного порога для габапентина ( $302 \pm 17,7$ ,  $p < 0,001$ ), морфина ( $317 \pm 27,6$ ,  $p < 0,001$ ) и соединения I-1 в дозе 10 мг/кг ( $387 \pm 30,2$ ,  $p < 0,001$ ) статистически различались и демонстрировали эффективность по сравнению с группой, получавшей только плацебо. Через 180 мин только величина ноцицептивного порога для соединения I-1 в дозе 10 мг/кг ( $319 \pm 23,1$ ,  $p < 0,001$ ) статистически отличалась и демонстрировала эффективность по сравнению с группой, получавшей только плацебо. Через 240 мин после введения ни одна группа не была статистически значимой при сравнении с плацебо. На D21, на начальный момент времени, перед введением вещества, только величина ноцицептивного порога для соединения I-1 с дозой 10 мг/кг ( $259 \pm 25,6$ ,  $p < 0,01$ ) статистически отличалась при сравнении с группой, получавшей только плацебо, что указывало на то, что антигипералгезический эффект все еще присутствовал при  $C_{min}$ . Через 120 мин после введения дозы, в день D21, величины ноцицептивного порога для габапентина ( $274 \pm 19,2$ ,  $p < 0,01$ ), морфина ( $283 \pm 16,7$ ,  $p < 0,001$ ) и соединения I-1 в дозе 10 мг/кг ( $346 \pm 20,5$ ,  $p < 0,001$ ) были статистически различными и характеризовались эффективностью при сравнении с группой, получавшей только плацебо.

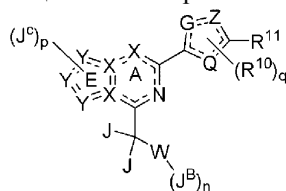
Вывод.

Соединение I-1 вызывало ответную антигипералгезическую реакцию при тестировании в дозе 10 мг/кг на STZ-модели диабетической нейропатии. Сильное обезболивающее действие наблюдалось в течение до 3 ч при уровнях, по меньшей мере, сравнимых с морфином или габапентином. Через 3 дня после введения соединения I-1 оказывало обезболивающее действие при испытании при  $C_{min}$ , что указывало на его продолжительное действие. Кроме того, при испытании через 4 дня после введения соединения I-1 сохраняло свою эффективность в STZ-модели нейропатической боли.

Несмотря на то, что в целях иллюстрации были описаны типичные варианты осуществления, тем не менее, предшествующие описания и примеры не следует рассматривать в качестве ограничений объема изобретения. Соответственно для любого специалиста в этой области является очевидным, что возможны различные модификации, адаптации и альтернативы без отклонения от сущности и объема настоящего изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

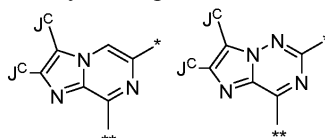
1. Соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль



Формула I

где

кольца E и A образуют сердцевину молекулы и представлены следующими формулами:



где атом С с символом \* представляет точку присоединения к кольцу, содержащему G, Z и Q; и атом С с символом \*\* представляет точку присоединения 2 представителей J;

W является кольцом В, которое представляет собой фенил;

каждый J независимо выбирают из водорода или метила,

n равен 1 и

каждый  $J^B$  представляет собой галоген;

p представляет собой целое число, выбранное из 1 или 2;

каждый  $J^C$  независимо выбирают из водорода, галогена,  $C_{1-4}$  алкила и -CN;

Q, G и Z, каждый независимо, представляет собой N;

q равен 0, 1 или 2;

$R^{10}$  представляет собой  $C_{1-6}$  алкил, необязательно и независимо замещенный 0-3 представителями  $R^{15}$ ;

$R^{11}$  представляет собой H,  $-NR^{a2}R^{b2}$ , галоген,  $C_{1-6}$  алкил, необязательно и независимо замещенный 0-3 представителями  $R^{15}$ , 5-6-членный гетероарил, необязательно и независимо замещенный 0-3 представителями  $R^{15}$ ,  $C_{3-8}$  циклоалкил, необязательно и независимо замещенный 0-3 представителями  $R^{15}$ , где 5-6-членный гетероарил содержит до 3 кольцевых гетероатомов, независимо выбранных из N, O или S;

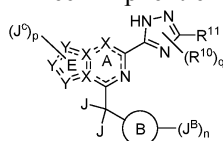
$R^{15}$  представляет собой галоген,  $-C(O)R^{b2}$ , фенил, необязательно и независимо замещенный 0-3 представителями  $R^{18}$  или 5- или 6-членный гетероарил, необязательно или независимо замещенный 0-3 представителями  $R^{18}$ , где каждое из 5- или 6-членного гетероарильного колец содержат до 3 кольцевых гетероатомов, независимо выбранных из N, O или S;

каждый  $R^{18}$  независимо выбирают из галогена и  $C_{1-6}$  алкила;

$R^{a2}$  представляет собой водород или  $C_{1-6}$  алкил и

$R^{b2}$  представляет собой водород или  $C_{1-6}$  алкил.

2. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение представляет собой соединение формулы III или его фармацевтически приемлемую соль



Формула III.

3. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $J^B$  находится в орто-положении относительно присоединения метиленового связующего звена между кольцом B и сердцевинной молекулы.

4. Соединение по любому из пп.1-3 или его фармацевтически приемлемая соль, где

J представляет собой водород;

$J^c$  представляет собой водород;

$R^{10}$  представляет собой  $C_{1-4}$  алкил, необязательно замещенный 1, 2 или 3 группами, независимо выбранными из галогена,  $-C(O)R^{b2}$ , фенила и 5- или 6-членного гетероарила, где фенил и 5- или 6-членный гетероарил необязательно замещены 1, 2 или 3 галогенами или  $C_{1-4}$  алкилами, где гетероарил включает 1, 2 или 3 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S;

q равен 0 или 1;

$R^{11}$  представляет собой H, галоген,  $-NR^{a2}R^{b2}$ ,  $C_{1-4}$  алкил, 5-6-членный гетероарил или  $C_{3-6}$  циклоалкил, где каждый  $C_{1-4}$  алкил, 5-6-членный гетероарил и  $C_{3-6}$  циклоалкил необязательно замещен 1, 2 или 3 представителями  $R^{15}$ , где  $R^{15}$  представляет собой галоген, и где гетероарил включает 1, 2 или 3 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S;

$R^{a2}$  представляет собой водород или  $C_{1-4}$  алкил и

$R^{b2}$  представляет собой водород или  $C_{1-4}$  алкил.

5. Соединение по любому из приведенных выше пунктов или его фармацевтически приемлемая соль, где  $R^{11}$  представляет собой  $C_{1-4}$  алкил, необязательно и независимо замещенный 1-3 представителями  $R^{15}$ .

6. Соединение по п.5 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $R^{11}$  представляет собой метил, необязательно и независимо замещенный 1-3 представителями  $R^{15}$ .

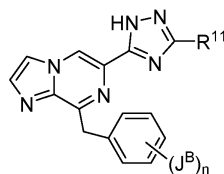
7. Соединение по п.5 или его фармацевтически приемлемая соль, где в каждом конкретном случае  $R^{15}$  представляет собой фтор.

8. Соединение по любому из приведенных выше пунктов или его фармацевтически приемлемая соль, где  $R^{11}$  представляет собой  $-CF_2H$ .

9. Соединение по любому из пп.1-7 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $R^{11}$  представляет собой  $-CF_3$ .

10. Соединение по любому из приведенных выше пунктов или его фармацевтически приемлемая соль, где q равен 0.

11. Соединение по п.1, где соединение представляет собой соединение формулы VI или его фармацевтически приемлемую соль



Формула VI

где

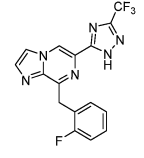
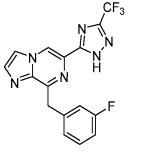
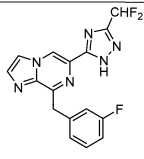
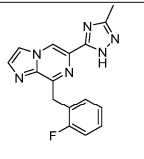
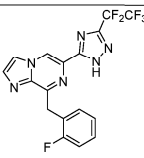
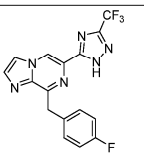
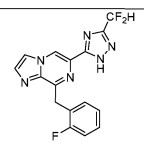
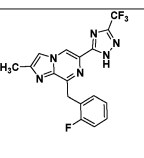
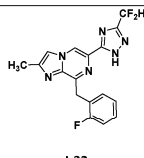
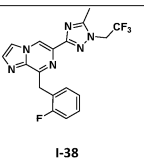
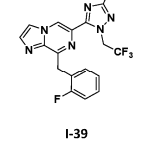
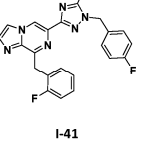
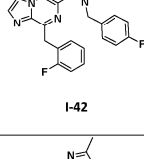
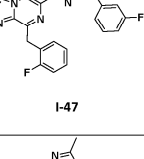
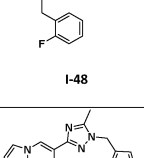
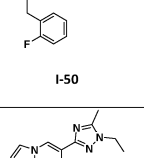
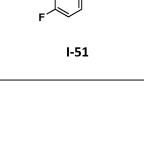
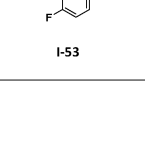
$R^{11}$  представляет собой H, галоген,  $-NR^{a2}R^{b2}$ ,  $C_{1-4}$  алкил, 5-6-членный гетероарил или  $C_{3-6}$  циклоалкил, где каждый  $C_{1-4}$  алкил, 5-6-членный гетероарил и  $C_{3-6}$  циклоалкил необязательно замещен 1, 2 или 3

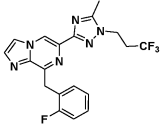
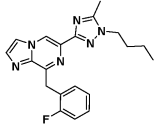
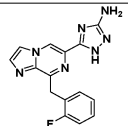
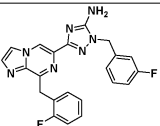
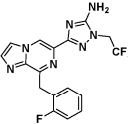
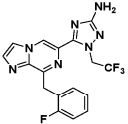
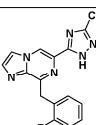
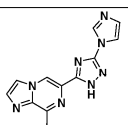
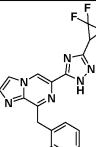
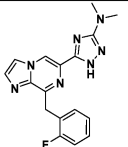
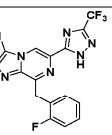
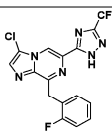
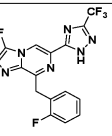
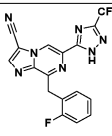
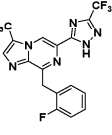
группами, независимо выбранными из галогена;

$R^{a2}$  представляет собой водород или  $C_{1-4}$  алкил и

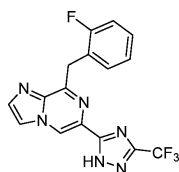
$R^{b2}$  представляет собой водород или  $C_{1-4}$  алкил.

12. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение выбрано из указанных ниже

 I-1	 I-2
 I-3	 I-4
 I-5	 I-12
 I-14	 I-31
 I-32	 I-38
 I-39	 I-41
 I-42	 I-47
 I-48	 I-50
 I-51	 I-53

 I-54	 I-56
 I-57	 I-58
 I-59	 I-60
 I-62	 I-63
 I-64	 I-65
 I-66	 I-67
 I-68	 I-70
 I-71	

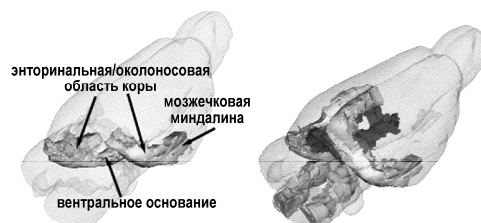
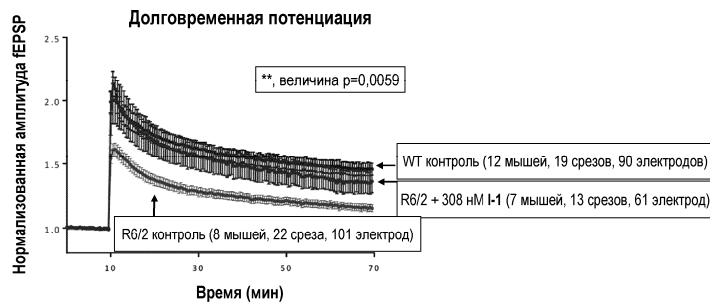
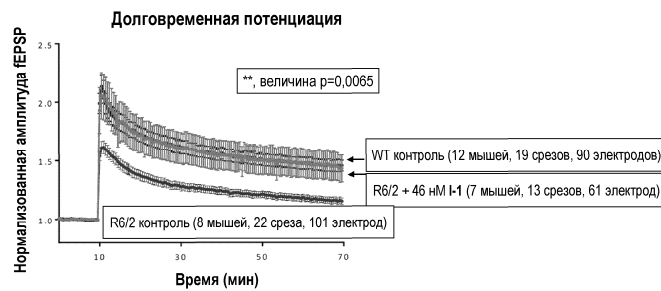
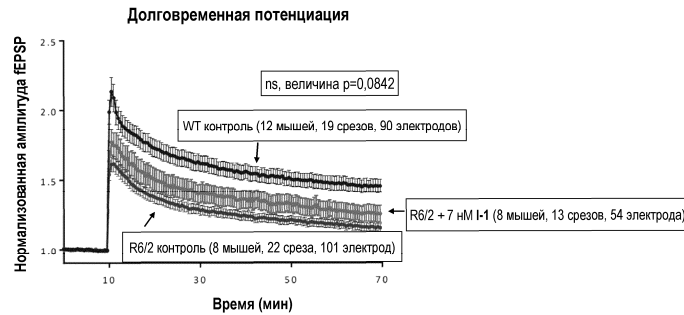
13. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение представляет собой



14. Фармацевтическая композиция, включающая соединение по любому из пп.1-13 или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество или носитель.

15. Способ лечения или предотвращения заболевания, состояния или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-13, или фармацевтической композиции по п.14 субъекту, где заболевание или расстройство является таким заболеванием или расстройством, в случае которого достигается положительный эффект в результате стимуляции sGC (растворимой гуанилатциклазы) или повышения концентрации NO (оксида азота) или cGMP (циклического гуанозин-3',5'-монофосфата), или и того и другого, или в результате повышения регуляции сигнального каскада NO.

16. Способ лечения смешанной деменции у субъекта, нуждающегося в лечении, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-13 или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п.14 субъекту, нуждающемуся в таком лечении.



Фиг. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2