

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041412**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.21

(21) Номер заявки
201991180

(22) Дата подачи заявки
2018.01.05

(51) Int. Cl. **C07D 233/91** (2006.01)
A61K 31/4168 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(54) **5-[(2,4-ДИНИТРОФЕНОКСИ)МЕТИЛ]-1-МЕТИЛ-2-НИТРО-1Н-ИМИДАЗОЛ**

(31) **62/443,244; 62/581,355; 62/585,326**

(32) **2017.01.06; 2017.11.03; 2017.11.13**

(33) **US**

(43) **2019.11.29**

(86) **PCT/US2018/012491**

(87) **WO 2018/129258 2018.07.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
РИВУС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Кхан Шахарьяр (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) **WO-A1-2010049768**
US-A1-2016008298

(57) Изобретение относится к 5-[(2,4-динитрофенокси)метил]-1-метил-2-нитро-1Н-имидазолу или его фармацевтически приемлемой соли, композиции, содержащей указанное соединение или соль, которые можно применять для лечения митохондриальных расстройств или состояний у млекопитающего, где расстройство или состояние выбрано из ожирения, диабета, резистентности к инсулину или непереносимости инсулина, неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), стеатоза печени, дислипидемии, сердечно-сосудистого заболевания, болезни сердца или атеросклероза.

В1

041412

041412

В1

Область техники

В настоящей заявке предложены новые фенильные производные. Новые соединения можно применять для регулирования активности митохондрий, снижения ожирения, лечения заболеваний, в том числе диабета и осложнений, связанных с диабетом.

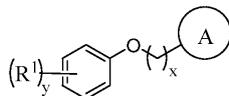
Уровень техники

Ожирение представляет собой хорошо известный фактор риска развития многих распространенных заболеваний, таких как диабет 2 типа (T2D) и неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD). Ожирением следует считать любую степень избыточного отложения жира, которая создает риск для здоровья. В случае, когда потребление энергии превышает расходование, избыточные калории накапливаются преимущественно в жировой ткани, и, если указанный чистый положительный баланс является продолжительным, возникает ожирение, то есть существуют два компонента стабильности массы тела, и аномалии с любой стороны (потребление или расходование) могут привести к ожирению. Для предотвращения ожирения можно увеличить расходование энергии или уменьшить потребление энергии. Следовательно, существует потребность в фармацевтических агентах, которые способны контролировать избыток жировой ткани, например, путем увеличения расходования энергии или уменьшения потребления энергии. Организм получает энергию за счет окисления пищи, такой как глюкоза и жирные кислоты. Известно, что митохондрии контролируют обмен веществ в отдельных клетках путем сжигания Сахаров и жиров. Одной из основных функций митохондрий является окислительное фосфорилирование, то есть процесс, в ходе которого энергия, полученная в результате метаболизма таких источников энергии, как глюкоза или жирные кислоты, преобразуется в АТФ (АТФ). Образование АТФ в митохондриях связано с окислением NADH, что приводит к транспортировке протонов в цепи переноса электронов. Химические разобщители (разобщающие агенты) могут препятствовать выработке эффективной энергии (АТФ) в клетках с митохондриями. Они расщепляют окислительное фосфорилирование путем переноса протонов через митохондриальную мембрану, что приводит к быстрому потреблению энергии (расходу энергии) без образования АТФ. Другими словами, разобщители заполняют митохондриальную матрицу протонами, и окисление NADH продолжается, однако вместо образования энергии в форме АТФ происходит рассеивание энергии протонного градиента в виде тепла. Применение химических разобщителей митохондрий с целью уменьшения отложений жира являются научной задачей на протяжении более восьмидесяти лет. См. Simkins S "Dinitrophenol and desiccated thyroid in the treatment of obesity: a comprehensive clinical and laboratory study". J Am Med Assoc 108: 2110 - 2117 (1937) и Fleury C et al, Nature Genetics 15, 269 - 272 (1997), Uncoupling Protein-2: A Novel Gene Linked to Obesity and Hyperinsulinemia. Наиболее известным химическим разобщителем является 2,4-динитрофенол (DNP), который, как было показано, увеличивает расходование энергии у людей, а также у животных. Однако химические разобщители нередко являются токсичными. Опасения по поводу опасных побочных эффектов привели к удалению DNP с рынка.

Существует потребность в безопасных митохондриальных разобщителях, которые способны безопасно обеспечивать требуемый медицинский эффект без вреда для человека. Раскрытые в настоящем описании новые фенильные производные удовлетворяют указанным потребностям.

Сущность изобретения

Предложено новое соединение, 5-[(2,4-динитрофенокс)метил]-1-метил-2-нитро-1H-имидазол или его фармацевтически приемлемая соль (Соединение А). Также в описании раскрыты соединения формулы I



Формула I

или фармацевтически приемлемые соли указанных соединений, где кольцо А представляет собой имидазол, замещенный 1-3 заместителями, независимо выбранными из -NO₂ и метила; каждый R¹ независимо представляет собой галоген, циано, NO₂, -C(O)H, -COOH, -C(O)O(C₁₋₄ алкил), -C(O)(C₁₋₄ алкил), C₁₋₄ алкил, C₁₋₄ алкенил или C₁₋₄ алкинил, где указанные C₁₋₄ алкил, C₁₋₄ алкенил и C₁₋₄ алкинил каждый независимо и необязательно замещены 1-3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, NO₂ и циано; у равен 1, 2 или 3 и x является целым числом от 1 до 6.

Указанные соединения можно применять для регулирования активности митохондрий, снижения ожирения, лечения заболеваний, включая нарушения обмена веществ, диабет или связанные с диабетом осложнения, такие как сердечные заболевания и почечная недостаточность, а также для снижения или контроля набора массы тела у млекопитающего.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена суммарная экспозиция DNP (серый цвет) и Соединения А (черный цвет), рассчитанная по площади под кривой (AUC) в течение первых 24 ч после перорального введения соединения, и соответствующая концентрация соединения, указанная под осью X. Половина животных, которым давали DNP, не выжили в исследовании, таким образом, LD₅₀ для DNP составила 100 мг/кг массы тела). На фиг. 2 представлено введение Соединения А мышам. Максимальная концентрация в

плазме (Сmax) остатка DNP значительно снижена по сравнению с непосредственным введением DNP, токсичность также значительно меньше. На фиг. 3 показано, что суммарная экспозиция DNP возрастает линейно по меньшей мере до 1500 мрк Соединения А. Суммарная экспозиция DNP после введения 100 мрк DNP на этом графике принята за 100%. Каждая точка данных представлена в виде черной точки. Прямая линейность ($Y = 0,1932 \cdot x + 13,94$) представлена сплошной черной линией, а 95%-ный доверительный интервал представлен пунктирными линиями. $R^2 = 0,9770$. Экспозиция на графике выражена в процентах от суммарной экспозиции DNP, при этом экспозиция после введения 100 мрк DNP принята за 100%.

На фиг. 4 показано, что максимальная концентрация DNP в плазме у мышей, которые получают Соединение А, линейно увеличивается в зависимости от дозы, но не достигает тех уровней, которые наблюдаются при введении дозы LD50 DNP. Максимальная концентрация DNP после введения 100 мрк DNP принята на данном графике за 100%. Каждая точка данных представлена в виде черной точки. Прямая линейность ($Y = 0/04178 \cdot x + 11,34$) представлена сплошной черной линией, а 95%-ный доверительный интервал представлен пунктирными линиями. $R^2 = 0,9770$.

На фиг. 5 представлена концентрация в плазме ферментов печени ALT, AST и ALP у мышей с индуцированной жировой болезнью печени после 4 недель введения Соединения А.

На фиг. 6 представлено содержание глюкозы в крови у животных, получавших Соединение А, в сравнении с аналогичными животными, не получавшими лечение, через 120 мин после введения глюкозы во всех трех группах лечения ($p < 0,05$ для лечения 25 и 100 мг/кг, $p < 0,01$ для лечения 5 мг/кг). Все различия между получавшими носитель и лечение являются статистически значимыми ($p < 0,05$). Глюкозотолерантный тест для перорального введения проводили после пяти недель лечения Соединением А.

На фиг. 7 представлены липидные капли в печени контрольной мыши у мышей с NASH (НАСГ), индуцированной диетой MCD (метионин-холиндефицитная).

На фиг. 8 представлены липидные капли мыши в печени мышей с NASH, индуцированной диетой MCD, которых лечили 5 мрк Соединения А.

На фиг. 9 представлено снижение уровня TNF α и IL-1 β в печени у мышей с NASH, индуцированной диетой MCD, которых лечили 5 мрк Соединения А.

На фиг. 10 представлен уровень TG в сыворотке для исследуемой группы из примера 5.

На фиг. 11 представлен уровень FFA в сыворотке для исследуемой группы из примера 5.

На фиг. 12 представлен уровень TG в печени для исследуемой группы из примера 5.

На фиг. 13 представлен уровень церамидов печени для исследуемой группы из примера 5.

На фиг. 14 представлены кривые потребления корма в исследуемых группах из примера 6.

На фиг. 15 представлен уровень свободной жирной кислоты (FFA) в третьей группе из примера 6. Следует отметить, что $p < 0,05$ по сравнению с $p < 0,01$ при сравнении с группой, получавшей носитель (среднее \pm SEM).

На фиг. 16 представлены уровни TG (триглицеридов) в крови из примера 6, которые свидетельствуют о том, что результаты в группах лечения были ниже, чем в контрольной группе, получавшей носитель, во всех исследуемых группах.

На фиг. 17 показано, что TG в печени также были ниже во всех исследуемых группах в примере 6, и снижение имело статистическую значимость в группе, получавшей наивысшие уровни Соединения А (5,0 мг/кг) с $p < 0,05$ по сравнению с группой, получавшей носитель (среднее \pm SEM).

На фиг. 18 показано, что уровни инсулина в крови были ниже во всех группах лечения в примере 6.

На фиг. 19 представлен эффект сорафениба по отдельности и в комбинации с Соединением А при лечении ортотопической модели рака печени человека Hep3B-luc, как описано в примере 7.

На фиг. 20 представлена схема эксперимента и прогрессирование заболевания в модели диетиндуцированной неалкогольной жировой болезни печени у животных (см. Пример 8).

На фиг. 21 представлено изменение массы тела в модели диетиндуцированной неалкогольной жировой болезни печени у животных после введения западной диеты (неделя 0) и во время лечения (недели 12-20). Данные свидетельствуют о значительном снижении общей массы тела при лечении высокой дозой Соединения А (см. Пример 8).

На фиг. 22 представлено значительное общее снижение массы тела на модели диетиндуцированной неалкогольной жировой болезни печени у животных после восьми недель приема высокой дозы Соединения А (см. Пример 8).

На фиг. 23 представлен эффект низкой и высокой доз Соединения А в модели диетиндуцированной неалкогольной жировой болезни печени у животных на массу печени после приема в течение восьми недель (см. Пример 8).

На фиг. 24 представлен эффект низкой и высокой доз Соединения А в модели диетиндуцированной неалкогольной жировой болезни печени у животных на массу печени после приема в течение восьми недель (см. Пример 8).

На фиг. 25 представлен эффект низкой и высокой доз Соединения А в модели диетиндуцированной неалкогольной жировой болезни печени у животных на уровни ALT (аланинаминотрансаминазы) в сы-

воротке (см. Пример 8).

На фиг. 26 представлен эффект низкой и высокой доз Соединения А в модели диетиндуцированной неалкогольной жировой болезни печени у животных на уровне Alk Phos (щелочной фосфатазы) в сыворотке (см. Пример 8).

На фиг. 27 представлен эффект низкой и высокой доз Соединения А в модели диет-индуцированной неалкогольной жировой болезни печени у животных на уровне AST (аспартаттрансаминазы) в сыворотке (см. Пример 8).

На фиг. 28 представлен эффект низкой и высокой доз Соединения А в модели диетиндуцированной неалкогольной жировой болезни печени у животных на уровне ALB (альбумина) в сыворотке (см. Пример 8).

На фиг. 29 представлен рост клеток клеточных линий NCI-60, подвергнутых лечению Соединением А или DNP при 10 мкМ (см. Пример 10).

На фиг. 30 представлено образование DNP из 2 мкМ Соединения А в микросомах печени от разных видов и необходимость NADPH для указанного образования (см. Пример 11).

На фиг. 31 представлено 7-дневное исследование на мышах токсичности повторной дозы для оценки изменений в параметрах поведения и безопасности.

Соединение А при пероральном введении на уровнях до 500 мг/кг не вызывало дисфункции почек по результатам измерения креатинина в крови, в то время как введение всего 1 мг/кг или DNP привело к повышению уровня креатинина в крови. Изменения креатинина зависят от Стах.

На фиг. 32 представлен эффект высокой дозы Соединения А в модели диет-индуцированной неалкогольной жировой болезни печени у животных на уровне ALT, AST и ALP в сыворотке (см. Пример 8).

На фиг. 33 представлен эффект высокой дозы Соединения А на индексы активности NAS и SAF. Оба индекса были значительно понижены с помощью Соединения А.

Подробное описание изобретения

Определения

Все термины, используемые в данном документе, имеют значения, общепринятые для специалистов в области фармацевтики.

В настоящем документе эффективное количество определяется как количество, необходимое для оказания терапевтического эффекта на пациента, подвергаемого лечению, и, как правило, определяется на основании возраста, площади поверхности тела, массы и состояния пациента.

В настоящем описании термин "млекопитающее", "пациент" или "субъект" относится к любому животному, включая человека, домашний скот и домашних животных.

Словосочетание "домашнее животное" или "домашние животные" относится к животным, которых содержат как домашних животных. Примеры домашних животных включают кошек, собак и лошадей.

В настоящем описании термин "контролирование", "лечение" включает: (1) ингибирование заболевания, состояний или расстройств, то есть прекращение или уменьшение развития заболевания или его клинических симптомов/признаков; или (2) облегчение заболевания, то есть регресс заболевания или его клинических симптомов/признаков.

В настоящем описании термин "фармацевтически приемлемый" означает подходящий для применения для млекопитающих, домашних животных или домашнего скота.

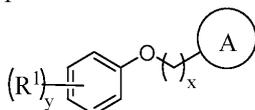
В настоящем описании термин "DNP" относится к 2,4-динитрофенолу или его соли, сольвату или аддукту.

В настоящем описании термин "нарушение обмена веществ" относится к состоянию, характеризующемуся изменением или нарушением метаболической функции.

В настоящем описании словосочетание "фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая представляет собой фармацевтически приемлемые нетоксичные кислоты, включая неорганические кислоты, органические кислоты, сольваты или гидраты.

В настоящем описании термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, стабилизатор, диспергирующий агент, суспендирующий агент, разбавитель, наполнитель, загуститель, растворитель или инкапсулирующий материал.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к соединениям Формулы I



Формула I

или фармацевтически приемлемую соль указанных соединений, где: кольцо А представляет собой имидазол, замещенный 1-3 заместителями, независимо выбранными из -NO₂ и метила; каждый R¹ независимо представляет собой галоген, циано, NO₂, -C(O)H, -COOH, -C(O)O(C₁₋₄ алкил), -C(O)(C₁₋₄ алкил), C₁₋₄ алкил, C₁₋₄ алкенил или C₁₋₄ алкинил, где указанные C₁₋₄ алкил, C₁₋₄ алкенил и C₁₋₄ алкинил каждый

независимо и необязательно замещены 1-3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, NO_2 и циано; у равен 1, 2 или 3 и x является целым числом от 1 до 6.

В некоторых вариантах реализации кольцо А представляет собой имидазол, замещенный 2 заместителями, независимо выбранными из $-\text{NO}_2$ и метила; каждый R^1 независимо представляет собой галоген, NO_2 , C_{1-4} алкил, C_{1-4} алкенил и C_{1-4} алкинил, где указанные C_{1-4} алкил и C_{1-4} алкенил каждый независимо и необязательно замещены 1-3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, NO_2 и циано; у равен 1, 2 или 3 и x является целым числом от 1 до 3.

В некоторых вариантах реализации кольцо А представляет собой имидазол, замещенный 2 заместителями, независимо выбранными из $-\text{NO}_2$ и метила; каждый R^1 независимо представляет собой галоген или NO_2 ; у равен 1, 2 или 3 и x является целым числом от 1 до 2.

В некоторых вариантах реализации кольцо А представляет собой имидазол, замещенный 2 заместителями, независимо выбранными из $-\text{NO}_2$ и метила; каждый R^1 независимо представляет собой галоген или NO_2 ; у равен 1, 2 или 3 и x является целым числом от 1 до 2.

В некоторых вариантах реализации кольцо А представляет собой имидазол, замещенный 2 заместителями, независимо выбранными из $-\text{NO}_2$ и метила; каждый R^1 представляет собой NO_2 ; у равен 1 или 2 и x является целым числом от 1 до 2.

В некоторых вариантах реализации кольцо А представляет собой имидазол, замещенный 2 заместителями, независимо выбранными из $-\text{NO}_2$ и метила; каждый R^1 представляет собой NO_2 ; у равен 2 и x равен 1.

В некоторых вариантах реализации кольцо А представляет собой 1-имидазолил, 5-имидазолил или 2-имидазолил.

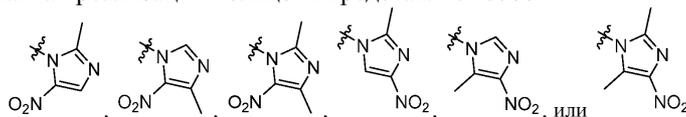
В некоторых вариантах реализации кольцо А представляет собой 1-имидазолил или 5-имидазолил.

В некоторых вариантах реализации кольцо А представляет собой 1-имидазолил.

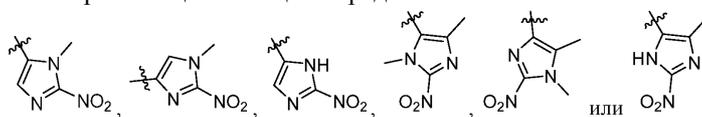
В некоторых вариантах реализации кольцо А представляет собой 5-имидазолил.

В некоторых вариантах реализации кольцо А представляет собой 2-имидазолил.

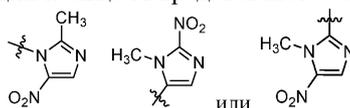
В некоторых вариантах реализации кольцо А представляет собой



В некоторых вариантах реализации кольцо А представляет собой



В некоторых вариантах реализации кольцо А представляет собой

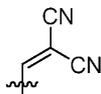


В некоторых вариантах реализации каждый R^1 независимо представляет собой галоген, циано, NO_2 , C_{1-4} алкил или C_{1-4} алкенил, где указанные C_{1-4} алкил и C_{1-4} алкенил каждый независимо и необязательно замещены 1-3 циано- или фторзаместителями.

В некоторых вариантах реализации галогенный заместитель выбран из Cl и Br . В другом варианте реализации R^1 представляет собой CH_2F , CHF_2 или CF_3 .

В некоторых вариантах реализации каждый C_{1-4} алкил независимо представляет собой метил, этил, пропил или бутил. В некоторых других вариантах реализации каждый C_{1-4} алкил независимо представляет собой пропил или бутил. В других вариантах реализации каждый C_{1-4} алкил независимо представляет собой бутил. В дополнительном варианте реализации каждый C_{1-4} алкил представляет собой трет-бутил.

В некоторых вариантах реализации каждый C_{1-4} алкенил независимо представляет собой этенил, аллил, бут-3-ен-1-ил или бут-2-ен-1-ил, необязательно замещенный 1-3 цианозаместителями. В некоторых других вариантах реализации указанный C_{1-4} алкенил замещен двумя цианозаместителями. В другом варианте реализации указанный C_{1-4} алкенил представляет собой

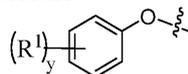


В некоторых вариантах реализации R^1 представляет собой NO_2 .

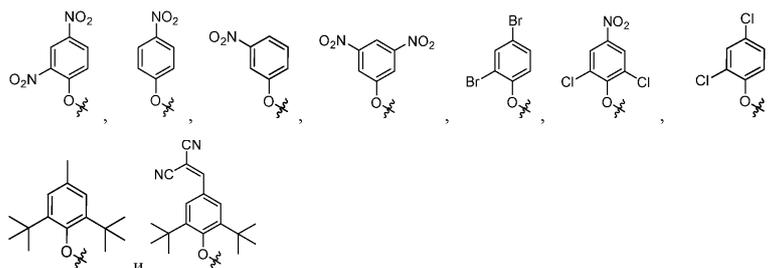
В некоторых вариантах реализации R^1 представляет собой галоген или NO_2 .

В некоторых вариантах реализации у равен 2 и каждый R^1 представляет собой NO_2 или галоген.

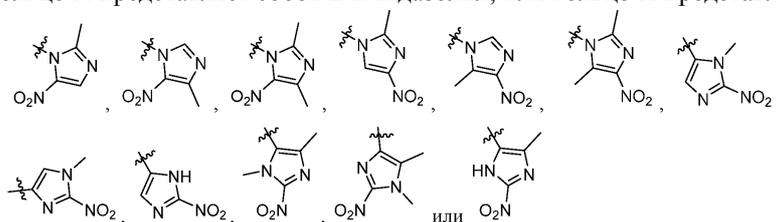
В некоторых вариантах реализации фрагмент



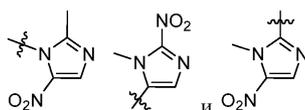
выбран из



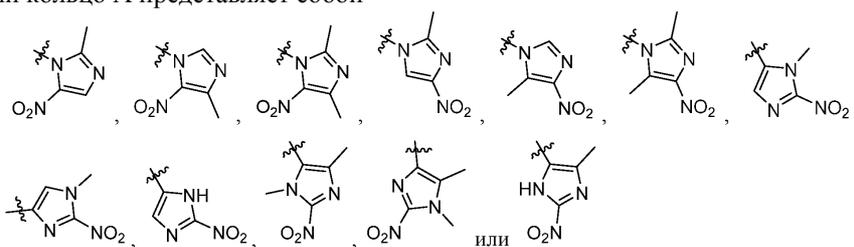
В некоторых вариантах реализации каждый R^1 независимо представляет собой галоген, циано, NO_2 , C_{1-4} алкил или C_{1-4} алкенил, где указанные C_{1-4} алкил и C_{1-4} алкенил каждый независимо и необязательно замещены 1-3 цианозаместителями, и кольцо А представляет собой имидазол, замещенный 2 заместителями, независимо выбранными из $-\text{NO}_2$ или метила; или кольцо А представляет собой имидазол, замещенный одним $-\text{NO}_2$ и одним метилом; или кольцо А выбрано из группы, состоящей из 1-имидазолила, 5-имидазолила и 2-имидазолила; или кольцо А выбрано из группы, состоящей из 1-имидазолила и 5-имидазолила; или кольцо А представляет собой 1-имидазолил; или кольцо А представляет собой 5-имидазолил; или кольцо А представляет собой 2-имидазолил; или кольцо А представляет собой



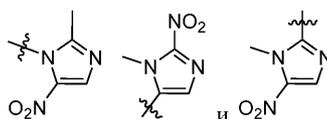
или кольцо А выбрано из



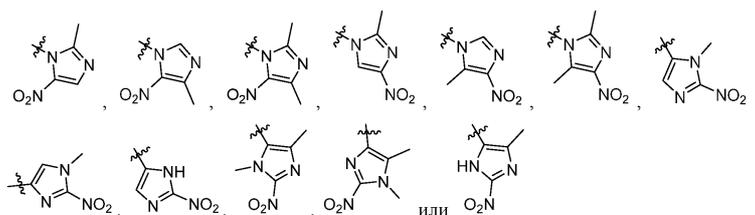
В некоторых вариантах реализации каждый R^1 независимо представляет собой Cl, Br, циано, NO_2 , метил, этил, пропил, бутилэтинил, аллил, бут-3-ен-1-ил или бут-2-ен-1-ил, где указанный этинил, аллил, бут-3-ен-1-ил или бут-2-ен-1-ил необязательно замещен 1-3 цианозаместителями, и кольцо А представляет собой имидазол, замещенный 2 заместителями, независимо выбранными из $-\text{NO}_2$ или метила; или кольцо А представляет собой имидазол, замещенный одним $-\text{NO}_2$ и одним метилом; или кольцо А выбрано из группы, состоящей из 1-имидазолила, 5-имидазолила и 2-имидазолила; или кольцо А выбрано из группы, состоящей из 1-имидазолила и 5-имидазолила; или кольцо А представляет собой 1-имидазолил; или кольцо А представляет собой 5-имидазолил; или кольцо А представляет собой 2-имидазолил; или кольцо А представляет собой



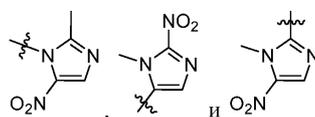
или кольцо А выбрано из



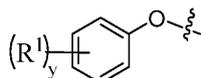
В некоторых вариантах реализации каждый R^1 независимо представляет собой Cl, Br, циано, NO_2 , метил, трет-бутил или этинил, где указанный этинил необязательно замещен 1-3 цианозаместителями и кольцо А представляет собой имидазол, замещенный 2 заместителями, независимо выбранными из $-\text{NO}_2$ или метила; или кольцо А представляет собой имидазол, замещенный одним $-\text{NO}_2$ и одним метилом; или кольцо А выбрано из группы, состоящей из 1-имидазолила, 5-имидазолила и 2-имидазолила; или кольцо А выбрано из группы, состоящей из 1-имидазолила и 5-имидазолила; или кольцо А представляет собой 1-имидазолил; или кольцо А представляет собой 5-имидазолил; или кольцо А представляет собой 2-имидазолил; или кольцо А представляет собой



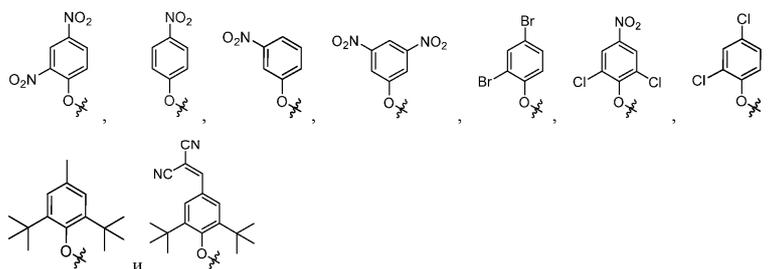
или кольцо А выбрано из



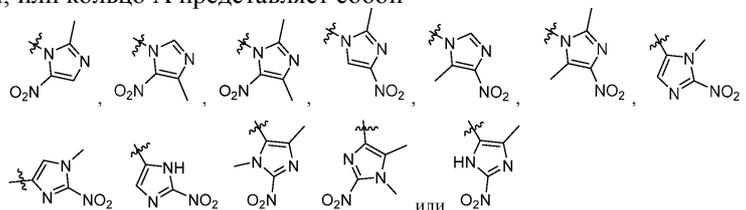
В некоторых вариантах реализации фрагмент



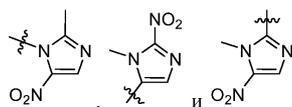
выбран из



и кольцо А представляет собой имидазол, замещенный 2 заместителями, независимо выбранными из -NO₂ или метила; или кольцо А представляет собой имидазол, замещенный одним -NO₂ и одним метилом; или кольцо А выбрано из группы, состоящей из 1-имидазолила, 5-имидазолила и 2-имидазолила; или кольцо А выбрано из группы, состоящей из 1-имидазолила и 5-имидазолила; или кольцо А представляет собой 1-имидазолил; или кольцо А представляет собой 5-имидазолил; или кольцо А представляет собой 2-имидазолил;



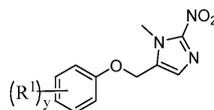
или кольцо А выбрано из



В некоторых вариантах реализации у равен 1. В некоторых вариантах реализации у равен 2. В некоторых вариантах реализации у равен 3.

В некоторых вариантах реализации х представляет собой целое число от 1 до 3. В другом варианте реализации х равен 1. В другом варианте реализации х равен 2.

В некоторых вариантах реализации соединения, раскрытые в настоящем описании, могут быть представлены формулой Па:

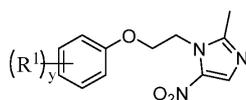


Формула Па

или фармацевтически приемлемой солью соединения, где R¹ и у определены выше. В некоторых вариантах реализации формулы Па у равен 1, а R¹ представляет собой NO₂. В другом варианте реализации у равен 2 и каждый R¹ независимо представляет собой NO₂ или галоген. В другом варианте реализации у равен 2 и каждый R¹ независимо представляет собой NO₂, Cl или Br. В другом варианте реализации у равен 3 и каждый R¹ независимо представляет собой NO₂ или Cl. В другом варианте реализации у равен 3 и каждый R¹ независимо представляет собой метил или трет-бутил. В другом варианте реализации у

равен 3 и каждый R¹ независимо представляет собой трет-бутил или

В некоторых вариантах реализации соединения, раскрытые в настоящем описании, могут быть представлены формулой Пб



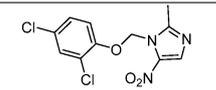
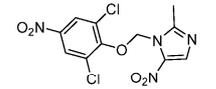
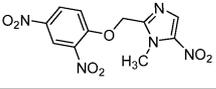
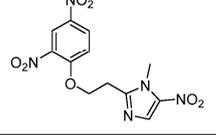
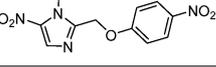
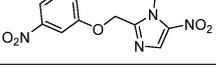
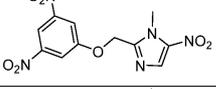
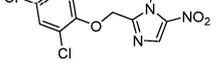
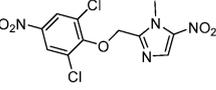
Формула Пб

или фармацевтически приемлемой солью соединения, где R^1 и y определены выше. В некоторых вариантах реализации формулы Пб y равен 1 и каждый R^1 независимо представляет собой NO_2 . В другом варианте реализации y равен 2, и каждый R^1 независимо представляет собой NO_2 или галоген. В другом варианте реализации y равен 2, и каждый R^1 независимо представляет собой NO_2 или Cl . В другом варианте реализации y равен 3 и каждый R^1 независимо представляет собой NO_2 или Cl .

В одном из вариантов реализации новое соединение в соответствии с настоящим изобретением выбрано из соединений, перечисленных в табл. А ниже.

Таблица А

Соединение №	Название	Структурная формула
1	1-[2-(2,4-Динитрофенокси)этил]-2-метил-5-нитро-1Н-имидазол	
2 (Соединение А)	5-[(2,4-Динитрофенокси)метил]-1-метил-2-нитро-1Н-имидазол	
3	1-Метил-2-нитро-5-[(4-нитрофенокси)метил]-1Н-имидазол	
4	1-Метил-2-нитро-5-[(3-нитрофенокси)метил]-1Н-имидазол	
5	5-[(3,5-Динитрофенокси)метил]-1-метил-2-нитро-1Н-имидазол	
6	5-[(2,4-Дихлорфенокси)метил]-1-метил-2-нитро-1Н-имидазол	
7	5-[(2,4-Дибромфенокси)метил]-1-метил-2-нитро-1Н-имидазол	
8	5-[(2,6-Дихлор-4-нитрофенокси)метил]-1-метил-2-нитро-1Н-имидазол	
9	2-[3,5-Ди-трет-бутил-4-((1-метил-2-нитро-1Н-имидазол-5-ил)метокси)бензиден]малононитрил	
10	5-[(2,6-Ди-трет-бутил-4-метилфенокси)метил]-1-метил-2-нитро-1Н-имидазол	
11	2-Метил-5-нитро-1-[(4-нитрофенокси)метил]-1Н-имидазол	
12	2-Метил-5-нитро-1-[(3-нитрофенокси)метил]-1Н-имидазол	
13	1-[(3,5-Динитрофенокси)метил]-2-метил-5-нитро-1Н-имидазол	

14	1-[(2,4-Дихлорфенокси)метил]-2-метил-5-нитро-1H-имидазол	
15	1-[(2,6-Дихлор-4-нитрофенокси)метил]-2-метил-5-нитро-1H-имидазол	
16	2-[(2,4-Динитрофенокси)метил]-1-метил-5-нитро-1H-имидазол	
17	2-[2-(2,4-Динитрофенокси)этил]-1-метил-5-нитро-1H-имидазол	
18	1-Метил-5-нитро-2-[(4-нитрофенокси)метил]-1H-имидазол	
19	1-Метил-5-нитро-2-[(3-нитрофенокси)метил]-1H-имидазол	
20	2-[3,5-Динитрофенокси)метил]-1-метил-5-нитро-1H-имидазол	
21	2-[(2,4-Дихлорфенокси)метил]-1-метил-5-нитро-1H-имидазол	
22	2-[(2,6-Дихлор-4-нитрофенокси)метил]-1-метил-5-нитро-1H-имидазол	

В одном из вариантов реализации настоящее изобретение обеспечивает новое соединение 5-[(2,4-Динитрофенокси)метил]-1-метил-2-нитро-1H-имидазол или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте реализации новое соединение в соответствии с настоящим изобретением можно применять для лечения митохондриальных заболеваний, включая, но не ограничиваясь ими, ожирение, диабет, инсулиновую резистентность и сердечную или почечную недостаточность у млекопитающего, нуждающегося в этом.

В другом варианте реализации новое соединение в соответствии с настоящим изобретением можно применять для лечения заболеваний, расстройств и состояний, связанных с нарушениями митохондриальной функции у млекопитающего, нуждающегося в этом.

В другом варианте реализации новое соединение в соответствии с настоящим изобретением может стимулировать скорость потребления кислорода (OCR) у млекопитающего, нуждающегося в этом.

В другом варианте реализации новое соединение в соответствии с настоящим изобретением можно применять для лечения диабетических заболеваний, включая, но не ограничиваясь следующими, неалкогольное жировое заболевание печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), стеатоз печени и диабет 2 типа (T2DM) у млекопитающего, нуждающегося в этом.

В другом варианте реализации новое соединение в соответствии с настоящим изобретением можно применять для лечения липодистрофии (приобретенной или наследственной) у млекопитающего, нуждающегося в этом.

В другом варианте реализации новое соединение в соответствии с настоящим изобретением можно применять для лечения гипертриглицеридемии у млекопитающего, нуждающегося в этом.

В другом варианте реализации новое соединение в соответствии с настоящим изобретением можно применять для лечения метаболических заболеваний или нарушений у млекопитающего, нуждающегося в этом.

В другом варианте реализации новое соединение в соответствии с настоящим изобретением можно применять для лечения ожирения или уменьшения ожирения у млекопитающего, нуждающегося в этом.

В другом варианте реализации новое соединение в соответствии с настоящим изобретением можно применять для лечения или профилактики увеличения массы тела или поддержания массы тела у млекопитающего, нуждающегося в этом.

В другом варианте реализации новое соединение в соответствии с настоящим изобретением можно применять для лечения или профилактики ожирения или избытка жира в организме у млекопитающего, нуждающегося в этом.

В другом варианте реализации новое соединение в соответствии с настоящим изобретением можно применять для лечения дислипидемии у млекопитающего, нуждающегося в этом.

В другом варианте реализации новое соединение в соответствии с настоящим изобретением можно применять для лечения сердечно-сосудистых заболеваний у млекопитающих, нуждающихся в этом.

В другом варианте реализации новое соединение в соответствии с настоящим изобретением можно применять для лечения болезней сердца у млекопитающих, нуждающихся в этом.

В другом варианте реализации новое соединение в соответствии с настоящим изобретением можно применять для лечения сердечно-сосудистых заболеваний у млекопитающих, нуждающихся в этом.

В другом варианте реализации новое соединение в соответствии с настоящим изобретением можно применять для лечения атеросклероза у млекопитающего, нуждающегося в этом.

В другом варианте реализации новое соединение в соответствии с настоящим изобретением можно применять для лечения или профилактики ишемического реперфузионного повреждения у млекопитающего, нуждающегося в этом.

В другом варианте реализации новое соединение в соответствии с настоящим изобретением можно применять для лечения воспаления и фиброза, приводящего к NASH.

В другом варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает фармацевтические композиции, содержащие фармацевтически приемлемый носитель и новое соединение в соответствии с настоящим изобретением.

Пути введения

При терапевтическом применении для лечения или профилактики увеличения массы тела млекопитающего соединение в соответствии с настоящим изобретением или его фармацевтические композиции можно вводить перорально или парентерально.

В некоторых вариантах реализации соединение в соответствии с настоящим изобретением или его фармацевтические композиции можно вводить один раз в день перорально.

Фармацевтические соли

Соединение формулы I может быть использовано в нативной форме или в виде соли. В случаях, когда требуется получение стабильной нетоксичной кислоты или основной соли, может быть целесообразным введение соединения в виде фармацевтически приемлемой соли.

Подходящие фармацевтически приемлемые соли включают соли, полученные из неорганических и органических кислот, включая сульфат, гидросульфат, соли соляной, бромистоводородной, йодистоводородной, азотной, угольной, серной, фосфорной, муравьиной, уксусной, пропионовой, янтарной, гликолевой, глюконовой, молочной, яблочной, винной, лимонной, аскорбиновой, глюкуроновой, малеиновой, фумаровой, пировиноградной, аспарагиновой, глутаминовой, бензойной, антралиновой, 4-гидроксibenзойной, фенилацетатной, миндальной, эмбоновой (памовой), метансульфоновой, этансульфоновой, бензолсульфоновой, пантотеновой, трифторметансульфоновой, сульфаниловой, стеариновой, альгиновой, 2-гидроксиэтансульфоновой, п-толуолсульфоновой, циклогексиламиноссульфоновой, салициловой, галактаровой, β -гидроксибутириновой и галактуроновой кислот; или полученные из солей аммония и солей металлов, включая соли кальция, магния, калия, натрия и цинка.

Композиция/Состав

Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением могут быть приготовлены способами, хорошо известными в данной области техники, например, с помощью известных процессов смешивания, растворения, гранулирования, дражирования, левитации, эмульгирования, инкапсулирования, улавливания, лиофилизации или распылительной сушки.

Фармацевтические композиции для применения в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены известным способом с использованием одного или нескольких фармацевтически приемлемых носителей, содержащих эксципиенты и вспомогательные вещества, облегчающие включение активных соединений в препараты, которые могут быть использованы для фармацевтического применения. Подходящее получение зависит от выбранного способа введения. Фармацевтически приемлемые эксципиенты и носители в целом известны специалистам в данной области техники и, таким образом, включены в настоящее изобретение. Указанные эксципиенты и носители описаны, например, в "Remington's Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., New Jersey (1991). Дозировка

Фармацевтические композиции, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают композиции, в которых активные ингредиенты содержатся в количестве, достаточном для достижения поставленной цели, то есть для лечения или профилактики увеличения массы тела или поддержания массы тела.

Количество активного компонента, который представляет собой новое соединение в соответствии с настоящим изобретением, в фармацевтической композиции и его однократной дозе можно изменять или регулировать в зависимости от активности конкретного соединения и требуемой концентрации. Определение терапевтически эффективного количества находится в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Как правило, количество активного компонента составляет от 0,01 до 99,9 мас.% композиции.

Как правило, терапевтически эффективное количество дозы активного компонента может составлять от примерно 0,001 до примерно 1000 мг/кг массы тела/день. Требуемая доза для удобства применения может быть представлена в виде однократной дозы или в виде нескольких доз, которые вводят через

соответствующие интервалы, например, в виде двух, трех, четырех или более частей дозы в сутки.

В других вариантах реализации эффективное количество нового соединения в соответствии с настоящим изобретением составляет от примерно 0,01 до примерно 1000 мг/кг, а также любое и все целые или частичные приращения между ними, включая примерно 0,1 мг/кг, примерно 1 мг/кг, примерно 0,01 мг/кг, примерно 0,1 мг/кг, примерно 1 мг/кг, примерно 10 мг/кг и примерно 100 мг/кг.

В некоторых вариантах реализации эффективное количество нового соединения составляет примерно 100-50 мг/кг. В некоторых вариантах реализации эффективное количество нового соединения составляет примерно 50-10 мг/кг. В других вариантах реализации эффективное количество нового соединения составляет примерно 10-5 мг/кг. В других вариантах реализации эффективное количество нового соединения составляет примерно 5-2,5 мг/кг.

Примеры

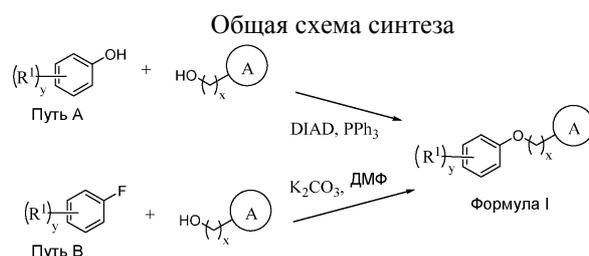
Определения:

ALT = аланинаминотрансминаза.

AST = аспартаттрансминаза.

ALP = щелочная фосфатаза.

ALB = альбумин.



Соединения формулы I могут быть получены методами синтеза, известными специалистам в данной области техники. Два способа представлены на схеме 1, где переменные кольцо A, R¹, x и y определены выше и не ограничены каким-либо образом. Возможны многие другие способы синтеза соединений в соответствии с изобретением. Как указано на схеме A, можно использовать реакцию Мицунобу для активации гидроксильного кислорода в соединении имидазола с помощью комбинации реагентов, таких как диизопропилазодикарбоксилат (DIAD) или диэтилазодикарбоксилат (DEAD), с трифенилфосфином, что приводит к нуклеофильному замещению активированного гидроксила фенолом.

Соединения формулы I также могут быть получены путем нуклеофильного ароматического замещения по схеме B. В таком случае фторфенильное соединение вступает в реакцию с соединением имидазола в умеренно основных условиях, например, карбонат калия в диметилформамиде. Замена фторида гидроксильной группой соединения имидазола обеспечивает эфирную связь соединения формулы I.

Пример 1. Концентрация в плазме DNP и Соединения A после введения DNP или Соединения A

Материалы и методы:

Самцов мышей C57BL/6 в возрасте 5-7 недель с массой тела 18-20 г получали от Beijing Vital River Co., LTD. Животных помещали в карантин в поликарбонатных клетках в хорошо проветриваемом помещении с контролируемой окружающей средой при температуре (22 ± 3°C), относительной влажности 40-80%, с ламинарным потоком, по 3 животных в каждой клетке в течение 7 дней до и во время исследования. Освещение люминисцентными лампами обеспечивали в течение примерно 12 ч в сутки. Подстилку из стержней кукурузы меняли один раз в неделю. Каждому животному был присвоен идентификационный номер. Мыши имели неограниченный доступ к стерилизованному облучением сухому гранулированному корму (Beijing Keaoxieli Feed Co., Ltd., Пекин, Китай) и стерильной питьевой воде в течение всего периода исследования.

Животных случайным образом распределяли (n = 4) в соответствующие группы в зависимости от массы тела с использованием компьютерной рандомизации. Следующие дозы вводили через желудочный зонд в 7,1% DMSO в физиологическом растворе: только носитель (7,1% DMSO в физиологическом растворе), 100 мг/кг DNP и 1, 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 1000, 1250, 1500 мг/кг Соединения A. DNP получали от Sinopharm Chemical Reagent Beijing Co., Ltd. DMSO получали от Sigma Aldrich.

Плазму собирали с помощью глазничной пункции в центрифужные пробирки объемом 0,5 мл с гепариновым покрытием через 0, 15, 30, 45 мин, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 20 и 24 ч.

Образцы центрифугировали в течение 5 мин при скорости 4000 gcf на настольной центрифуге. Прозрачный супернатант переносили в новую пробирку и хранили при -80°C для ПК (фармакокинетического) анализа.

Проводили полный статистический анализ, уровень значимости был установлен на уровне P<0,05. Рассчитывали средние значения по группам и стандартные ошибки для всех параметров измерения в соответствии с планом исследования. Сравнительные анализы One way ANOVA между группами выполняли с помощью программного обеспечения SPSS 17.0.

Результаты:

Два (50%) животных, которым вводили DNP в дозе 100 мг/кг, умерли в течение первых 2 ч после введения, и одно из животных, которым вводили дозу 1500 мг/кг Соединения А, было обнаружено мертвым через 12 ч. Никаких других патологических клинических симптомов не наблюдалось в течение всего эксперимента. РК анализ показал, что Соединение А было гидролизовано до остатка DNP и Соединение А было обнаружено в плазме только в небольших количествах у животных с максимальной дозой. На фиг. 1 и 2 показано, что у животных, которым вводили Соединение А, максимальная концентрация в плазме (Stax) остатка DNP была значительно ниже, чем при непосредственном введении DNP. Ни в одной из групп, получавших Соединение А, не был достигнут такой же уровень Stax, как в группе, получавшей DNP. Ttax было отложено у животных, получавших Соединение А. При этом значительно более высокую суммарную экспозицию остатка DNP определяли у животных, получавших Соединение А, по сравнению с животными, получавшими DNP. Таким образом, Соединение А является более безопасным лекарственным средством, чем DNP, из-за снижения Stax. Как суммарная экспозиция, так и Stax остатка DNP линейно увеличиваются с ростом дозы Соединения А.

Пример 2. Концентрация в плазме ферментов печени ALT, AST и ALP после введения Соединения А мышам с индуцированной жировой болезнью печени

Самцов мышей C57BL/6 получали от Beijing Vital River Co., LTD. Животных помещали в карантин в поликарбонатных клетках в хорошо проветриваемом помещении с контролируемой окружающей средой при температуре ($22 \pm 3^\circ\text{C}$), относительной влажности 40-80%, с ламинарным потоком, по 3 животных в каждой клетке в течение 7 дней до и во время исследования. Освещение люминисцентными лампами обеспечивали в течение примерно 12 ч в сутки. Мыши имели неограниченный доступ к стерилизованному облучением сухому гранулированному корму (Beijing Keaoxieli Feed Co., Ltd., Пекин, Китай) и стерильной питьевой воде в течение первой недели. После акклиматизации и в течение всего периода исследования корм заменяли на метионин/холиндефицитный корм (MCD), чтобы индуцировать у животных неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD). После четырех недель на MCD животных делили на четыре группы ($n = 8$) и вводили Соединение А в дозе 0 мрк, 5 мрк, 25 мрк или 100 мрк перорально через желудочный зонд в 7,1% DMSO в физиологическом растворе.

Кровь собирали в пробирку без антикоагулянта, образцы сыворотки немедленно обрабатывали центрифугированием при 4°C , 6000 g в течение 15 мин, а затем помещали в новую пробирку. Проводили анализ образцов на три фермента печени - ALT, AST и ALP - с использованием автоматического биохимического анализатора TOSHIBA TBA-40FR.

Результаты:

Как показано на фиг. 5, уровни ALT и AST резко возросли у мышей, получавших MCD. Указанные уровни снижались в зависимости от дозы Соединения А. Статистически значимые снижения наблюдали при 5 и 100 мрк, тогда как статистическая значимость достигнута только в группе с уровнем дозы 25 мрк при исключении двух статистических выбросов из анализа.

Пример 3. Пероральный глюкозотолерантный тест после введения Соединения А мышам с индуцированной жировой болезнью печени

Мышей готовили, как описано в примере 2. Пероральный глюкозотолерантный тест (OGTT) проводили на всех исследуемых животных после пяти недель лечения Соединением А. Исходный уровень (время 0) уровня глюкозы измеряли после 16 ч голодания. После перорального введения 2 г/кг глюкозы уровни глюкозы в крови измеряли через 30, 60 и 120 мин с использованием системы Accu-Chek Performa.

Результаты:

Уровни глюкозы в крови были значительно ниже через 120 мин после теста на глюкозу во всех трех группах лечения ($p < 0,05$ для лечения 25 и 100 мг/кг, $p < 0,01$ для лечения 5 мг/кг). См. фиг. 6.

Пример 4. Оценка эффекта Соединения А на мышинной модели NASH (НАСГ), индуцированной диетой MCD.

Авторы настоящего изобретения показали, что Соединение А уменьшает стеатогепатит и воспалительные цитокины в печени мышей, больных NASH, индуцированным диетой MCD. Липидные капли уменьшались после 6 недель лечения. См. фиг. 7 и 8. Указанные изображения свидетельствуют о резком уменьшении накопления жира в печени после лечения 5 мг/кг Соединения А. На фиг. 7 представлены липидные капли в печени контрольной мыши у мышей с NASH, индуцированной диетой MCD. На фиг. 8 представлены липидные капли в печени мышей с NASH, индуцированной диетой MCD, которых лечили 5 мрк Соединения А. Липидные капли резко уменьшались после 6 недель лечения.

TNF α и IL-1 β в печени также понизились у мышей, подвергнутых лечению (см. фиг. 9).

Пример 5. Оценка эффекта Соединения А на модели NAFLD (НАЖБП) у крыс, индуцированной HFD.

Для оценки эффекта Соединения А на крысах, получавших диету с высоким содержанием жиров (HFD), Соединение А вводили перорально через желудочный зонд один раз в день в течение 14 дней. 50 крыс SD в возрасте от 6 до 8 недель были получены от Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd. Животных помещали в карантин по меньшей мере за 7 дней до начала исследования. Животных

содержали в помещениях с ламинарным потоком при постоянной температуре и влажности, стерильная питьевая вода была доступна без ограничения, в каждой клетке находилось одно животное. После 7-дневного периода акклиматизации крыс держали на диете с высоким содержанием жира (D12492, Research Diets) в течение двухнедельного индукционного периода. После индукционного периода животных случайным образом распределяли по соответствующим группам в зависимости от массы тела. Исследуемые группы и подробная информация о лечении приведены в табл. 1.

Таблица 1. Группа и лечение

Группа	Лечение	Доза (мг/кг)	HFD	Путь введения	Схема	Кол-во
1	Носитель	-	Да	PO	QD X14д	10
2	Соединение А	0,1	Да	PO	QD X14д	10
3	Соединение А	0,5	Да	PO	QD X14д	10
4	Соединение А	5	Да	PO	QD X14д	10
5	DNP	1	Да	PO	QD X14д	10

Животным вводили 5 мл/кг PO Соединения А, DNP или только носитель (7,5% DMSO в воде) перорально через желудочный зонд ежедневно в течение 14 дней (с 15-го по 28-й день). Массу тела всех животных измеряли два раза в неделю на протяжении всего исследования. Потребление пищи регистрировали для животных во всех группах два раза в неделю на протяжении всего исследования. Образцы крови собирали путем глазничной пункции в пробирку без антикоагулянта в 15-й день (до лечения), 22-й день и 29-й день. Образцы крови центрифугировали при 6000 g в течение 15 мин при 4°C, затем образцы сыворотки собирали и помещали в другую пробирку. Если анализ не проводили немедленно, образцы сыворотки хранили при -80°C. Уровни липидов, включая триглицериды (TG), общий холестерин (TCHO), холестерин липопротеинов высокой плотности (HDL-C), холестерин липопротеинов низкой плотности (LDL-C) и свободную жирную кислоту (FFA), измеряли в конце исследования с использованием автоматического биохимического анализатора TOSHIBA TBA-40FR. После эвтаназии животных во всех группах исследования на 29-й день проводили вскрытие.

Брали образцы ткани печени у всех животных, каждый образец печени разрезали на 3 фрагмента: один для анализа уровня липидов в печени, один для гистологии, а последний фрагмент быстро замораживали в качестве резервного. В конце исследования уровни TG, TCHO, HDL-C, LDL-C и FFA в печени анализировали с использованием химического анализатора, а уровни церамидов в печени анализировали с использованием метода ЖХ-МС/МС.

Результаты исследования показали отсутствие существенных изменений или тенденций в толерантности к глюкозе (измеренной с помощью перорального глюкозотолерантного теста), массе тела или потреблении пищи между группами исследования.

Уровни FFA в сыворотке имели существенные различия после семи дней введения дозы по сравнению с носителем, однако уровни FFA и TG в сыворотке имели тенденцию к снижению в зависимости от дозы по сравнению с контрольным носителем (см. фиг. 8 и 9). Данные на фиг. 9 являются статистически достоверными с $p < 0,05$ (Т-критерий) при сравнении с группой, получавшей носитель (среднее \pm SEM). Результаты показывают, что Соединение А можно применять для снижения риска сердечно-сосудистых заболеваний, NASH и NAFLD. На диаграмме на фиг. 10 представлены уровни TG в сыворотке. На фиг. 10 $p < 0,05$ (ANOVA) (среднее \pm SEM). На диаграмме на фиг. 11 представлены уровни FFA в сыворотке.

Все уровни липидов в печени, включая TG, TCHO, HDL-C, LDL-C, FFA и церамиды, имеют тенденцию к снижению при всех дозах лечения. Значительное снижение FFA наблюдалось при двух самых высоких дозах Соединения А. Снижение уровня церамидов в печени также достигало значимости в группе с самой высокой дозировкой. На фиг. 12 представлены уровни TG в печени. На фиг. 13 представлены уровни церамидов в печени.

Пример 6. Оценка эффекта Соединения А у крыс с диабетическим ожирением (ZDF).

Для определения эффекта Соединения А, вводимого перорально через желудочный зонд один раз в день в течение 28 дней диабетическим крысам Цукера (ZDF), получили 50 самцов крыс от Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co.. Животных в возрасте 8 недель на начало индукции до проведения исследования помещали в карантин в течение 7 дней. Крыс содержали в помещениях с ламинарным потоком при постоянной температуре и влажности, по одному животному в каждой клетке, воду обеспечивали без ограничения в течение периодов карантина и исследования. После 7-дневного периода акклиматизации 50 крыс ZDF держали на специальной диете (диета Purina 5008) в течение 4 недель для индукции диабета 2 типа. После 4 недель индукции животных случайным образом распределяли по соответствующим группам в зависимости от массы тела и уровней глюкозы натощак. Исследуемые группы и количество животных в группе представлены в табл. 2.

Таблица 2. Группы и лечение

Группа	Лечение	Доза (мг/кг)	Путь введения	Схема	Количество
1	Носитель	-	PO	QD X28 д	10
2	DNP	1	PO	QD X28 д	10
3	Соединение А	0,1	PO	QD X28 д	10
4	Соединение А	0,5	PO	QD X28 д	10
5	Соединение А	5,0	PO	QD X28 д	10

Испытуемые препараты растворяли в 7% водном растворе DMSO (Sigma) (об/об) и вводили перорально в объеме 5 мл/кг один раз в день в течение 30 дней с 29-го по 58-й день. Композиции готовили два раза в неделю.

Массу тела измеряли два раза в неделю на протяжении всего исследования, потребление пищи (подача/удаление корма) регистрировали для животных во всех группах еженедельно на протяжении всего исследования.

Уровни глюкозы в крови исследуемых животных натошак измеряли еженедельно после периода индукции путем взятия крови из хвостовой вены с использованием системы Accu-Chek Performa. Все испытания проводили в 29-й (исходный уровень), 36-й, 43-й, 50-й и 57-й дни. Животные голодали в течение ночи (16 ч с 17:00 до 9:00 следующего дня) перед измерением.

Профиль липидов в сыворотке и уровни ферментов печени измеряли еженедельно после периода индукции, конкретные параметры химического состава крови приведены в табл. 3. Все испытания проводили в 29-й (исходный уровень), 36-й, 43-й, 50-й и 57-й дни. Кровь собирали из глазничных вен в пробирку без антикоагулянта, образцы сыворотки немедленно обрабатывали центрифугированием при 4°C, 6000 г в течение 15 мин, а затем помещали в новую пробирку. Уровни липидов и общий химический состав крови измеряли с использованием автоматического биохимического анализатора TOSHIBA TBA-40FR.

Таблица 3. Биохимический анализ крови

Категория	Сокращение	Определения
Фермент печени	ALT	Аланинаминотрансфераза
	AST	Аспартатаминотрансфераза
	ALP	Щелочная фосфатаза
Липид крови	TG	Триглицериды
	TCHO	Холестерин общий
	HDL-C	Холестерин липопротеинов высокой плотности
	LDL-C	Холестерин липопротеинов низкой плотности
	FFA	Свободная жирная кислота

Уровни инсулина у всех исследуемых животных измеряли на 57-й день методом ELISA. Для указанного анализа использовали сыворотку крови.

В последний день (59-й день) провели полное вскрытие и у всех животных изъяли печень. Образцы печени разделили на 3 фрагмента: 1/3 фиксировали в 10%-ном формалине и обрабатывали в гистологическом парафиновом блоке, 1/3 обрабатывали для измерения липидов (TG, TCHO, HDL-C, LDL-C и FFA), а оставшуюся 1/3 быстро замораживали и хранили при -80°C для дальнейшего анализа.

Статистические испытания проводили для всех данных, уровень значимости был установлен 5% или $P < 0,05$. Рассчитывали средние значения по группам и стандартные отклонения для всех параметров измерения в соответствии с планом исследования. Односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) использовали для групп с программным обеспечением GraphPad Prism 6.0.

Между исследуемыми группами не наблюдали никаких существенных изменений в массе тела и потреблении пищи, однако заметили тенденцию к более высокому потреблению пищи в группе с максимальной дозировкой Соединения А в комбинации с тенденцией к снижению массы тела во всех группах с различной дозировкой после 36-го дня в сравнении с носителем. На фиг. 14 представлены кривые потребления корма в исследуемых группах из примера 6.

На фиг. 15 представлены уровни NEFA (неэтерифицированной жирной кислоты, то есть свободной жирной кислоты (FFA)), которые были значительно ниже в двух группах, которым вводили самые высокие уровни Соединения А. Третья группа, 0,1 мг/кг, также имела тенденцию к снижению. См. фиг. 15. На фиг. 16 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с группой, получавшей носитель (среднее \pm SEM). На фиг. 16 представлены уровни TG (триглицеридов) в крови, результаты для которых были схожими и которые были ниже, чем у контрольного носителя, во всех исследуемых группах (среднее \pm SEM). См. фиг. 16. На

фиг. 17 показано, что уровень TG в печени также был ниже во всех исследуемых группах, и снижение действительно достигало статистической значимости в группе, получавшей самые высокие уровни Соединения А (5,0 мг/кг) * $p < 0,05$ по сравнению с группой, получавшей носитель (среднее \pm SEM). См. фиг. 17. На фиг. 18 показано, что уровни инсулина в крови были ниже во всех группах лечения. * $p < 0,05$ по сравнению с группой, получавшей носитель (среднее значение \pm SEM) (См. фиг. 18). Исследование показало, что Соединение А может быть эффективным для снижения риска сердечных и сердечно-сосудистых заболеваний и может быть использовано для лечения NAFLD, NASH и диабета 2 типа.

Пример 7. Оценка эффекта Соединения А в мышинной ортотопической модели рака печени человека Нер3В-luc.

Шестьдесят (60) самок голых мышей BALB/c помещали в карантин за 7 дней до исследования. В течение всего периода исследования животных содержали в стандартных лабораторных условиях и обеспечивали свободный доступ к стерилизованному облучением сухому гранулированному корму и стерильной питьевой воде. После периода карантина мышей инокулировали *in situ* 1×10^6 экспрессирующими люциферазу клетками Нер3В-luc, суспендированными в 10 мкл смеси MEM/Matrigel (7 : 3). Кожу и брюшину разрезали, чтобы обнажить левую долю печени у анестезированных мышей, клетки медленно вводили в левую долю печени, так что через капсулу печени был виден прозрачный пузырь клеток. Рост опухоли контролировали с помощью анализа изображений. На 14-й день мышей случайным образом распределяли с использованием компьютерной рандомизации на 6 групп на основе массы тела и значений биоломинесцентной визуализации (BLI) (10 мышей в группе) для обеспечения аналогичного среднего значения BLI среди групп. У исследуемых животных контролировали не только рост опухоли, но также поведение, например, подвижность, потребление пищи и воды (только путем проверки клетки), массу тела (BW), тусклость глаз/волос и любой другой аномальный эффект. Для измерения BLI мышам внутрибрюшинно вводили 15 мг/мл (при 5 мкл/г массы тела) D-люциферина (Pharmaron) и выполняли анестезию ингаляцией 1-2% изофлурана. Через 10 мин после инъекции люциферина проводили визуализацию мышей с использованием IVIS Lumina II (Caliper) два раза в неделю.

Программное обеспечение Living Image (Caliper) использовали для вычисления областей интереса (ROI) и определения общего биоломинесцентного сигнала в каждой ROI. Биоломинесцентные сигналы (фотоны/с) от ROI определяли количественно и использовали в качестве индикатора роста опухоли и противоопухолевой активности. Лечение начинали, когда средние биоломинесцентные сигналы опухоли достигали примерно 52×10^6 фотонов/с на 14-й день после инокуляции опухолевых клеток. Животных разделяли на следующие группы лечения ($n = 10$ /группа):

1. Контроль с помощью носителя
2. Сорафениба тозилат 80 мг/кг
3. Сорафениба тозилат 80 мг/кг + 25 мг/кг Соединение А
4. Сорафениба тозилат 80 мг/кг + 100 мг/кг Соединение А
5. Сорафениба тозилат 80 мг/кг + 200 мг/кг Соединение А
6. Сорафениба тозилат 80 мг/кг + 300 мг/кг Соединение А

Все лекарства растворяли в 7% DMSO + 20% гидроксипропил бета-циклодекстрин (HPBCD).

Никаких изменений массы тела не наблюдали ни в ходе испытаний, ни между исследуемыми группами. Сорафениб в качестве единственного агента оказывал влияние на снижение BLI опухоли печени человека Нер3В-luc при биоломинесценции *in vivo* после 28 дней последовательного лечения (см. фиг. 19). Однако указанный эффект не усилился за счет Соединения А ни при одном из испытанных уровней дозирования. Соединение А, по-видимому, не улучшает эффект сорафениба и не повышает чувствительность клеток к апоптозу. Фактически, у Сорафениба в отдельности был самый низкий показатель BLI в конце исследования. Все испытываемые препараты хорошо переносились в указанных условиях испытаний мышами с ортотопическими опухолями.

У всех животных не наблюдали никаких других серьезных клинических отклонений в течение периода лечения. На фиг. 19 представлен эффект Сорафениба по отдельности и в комбинации с Соединением А при лечении ортотопической модели рака печени человека Нер3В-luc.

Пример 8. Описание эффекта Соединения А в модели диетиндуцированной неалкогольной жировой болезни печени у животных.

В данном исследовании оценивали эффект Соединения А на стеатогепатит и прогрессирование фиброза на модели диетиндуцированной неалкогольной болезни печени (DIAMOND) у самцов мышей C57BL/6J(B6)-129s1/SvImJ (S129). Мышиная модель Sanyal DIAMOND представляет ключевые физиологические, метаболические, гистологические, транскриптомные изменения и изменения, связанные с клеточной сигнализацией, наблюдаемые у людей с прогрессирующим NASH. См. также *Journal of Hepatology* Volume 65, Issue 3, September 2016, Pages 579-588 "A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer" by A. Asgharpour et al.

Два уровня дозы Соединения А (суточная доза 1 или 5 мг/кг в носителе в течение 8 недель) сравнивали с контрольным носителем и данными предыдущих исследований на мышах с отрицательным контролем в зависимости от штамма при обычном питании (Harlan Normal Rodent Chow, TD 7012 Teklad

LM-485) и воде, очищенной обратным осмосом (RO).

В начале исследования (неделя 0) 30 самцов мышей в возрасте 8-12 недель получали без ограничения западную диету, Harlan 42% калорий от жира (Harlan TD. 88137) и подслащенную воду (SW 23,1 г/л d-фруктоза + 18,9 г/л d-глюкоза). После прогрессирования заболевания у мышей до стеатогепатита в течение 12 недель мышей случайным образом разделяли на три группы лечения (n = 10):

1. Контроль с помощью носителя - 0,5% водная натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы с 0,1% Tween-80 (VC)

2. Соединение А 1,0 мг/кг/день в носителе (низкая доза Соединения А)

3. Соединение А 5,0 мг/кг/день в носителе (высокая доза Соединения А)

Две дополнительные группы (данные предшествующих исследований) также были использованы для сравнения.

4. Отрицательный контроль - мыши питались нормальной диетой (отрицательный контроль 20 недель)

5. Положительный контроль - мыши, которых кормили западной диетой с подслащенной водой, без лечения, без принудительного питания (положительный контроль 20 недель) После восьми недель лечения после 20-й недели произвели вскрытие всех мышей. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что животные, получавшие дозу 5 мг/кг, имели значительное снижение массы тела на 20-й неделе. Животные в указанной группе также имели статистически значимое снижение массы печени, общего холестерина, ALT, ALP и ASP. Лобулярное воспаление было значительно уменьшено с помощью Соединения А. Индексы активности NAS и SAF были значительно снижены с помощью Соединения А. Отмечено значительное снижение прогрессирования до NASH с помощью Соединения А (только у одной мыши при введении Соединения А произошло прогрессирование до NASH, тогда как в случае контрольного носителя у всех мышей произошло прогрессирование до NASH). По результатам исследования Соединение А является эффективным для лечения NAFLD и NASH, а также может быть эффективным для снижения BMI при лечении ожирения и для снижения риска сердечных заболеваний. Указанные результаты приведены на следующих фигурах. На фиг. 20 представлена схема эксперимента и прогрессирование заболевания в модели диет-индуцированной неалкогольной жировой болезни печени у животных. На фиг. 21 представлено изменение массы тела в модели диет-индуцированной неалкогольной жировой болезни печени у животных после введения западной диеты (неделя 0) и во время лечения (недели 12-20). Данные свидетельствуют о значительном снижении общей массы тела при лечении высокой дозой Соединения А. На фиг. 22 представлено значительное общее снижение массы тела на модели диет-индуцированной неалкогольной жировой болезни печени у животных после восьми недель приема высокой дозы Соединения А. На фиг. 23 представлен эффект низкой и высокой доз Соединения А в модели диет-индуцированной неалкогольной жировой болезни печени у животных на массу печени после приема в течение восьми недель. На фиг. 24 представлен эффект низкой и высокой доз Соединения А в модели диетиндуцированной неалкогольной жировой болезни печени у животных на массу печени после приема в течение восьми недель. На фиг. 25 представлен эффект низкой и высокой доз Соединения А в модели диетиндуцированной неалкогольной жировой болезни печени у животных на уровни ALT (аланинаминотрансаминазы) в сыворотке. На фиг. 26 представлен эффект низкой и высокой доз Соединения А в модели диетиндуцированной неалкогольной жировой болезни печени у животных на уровни ALP (щелочной фосфатазы) в сыворотке. На фиг. 27 представлен эффект низкой и высокой доз Соединения А в модели диетиндуцированной неалкогольной жировой болезни печени у животных на уровни AST (аспартаттрансаминазы) в сыворотке. На фиг. 28 представлен эффект низкой и высокой доз Соединения А в модели диетиндуцированной неалкогольной жировой болезни печени у животных на уровни ALB (альбумина) в сыворотке.

Пример 9. Получение 5-[(2,4-динитрофенокси)метил]-1-метил-2-нитро-1H-имидазола (Соединение № 2 в табл. А или Соединение А).



2,4-динитрофенол (смоченный примерно 20% воды, от TCI America, номер в каталоге DO109) (масса во влажном состоянии 269 мг, масса в сухом состоянии 215 мг, 1,17 ммоль) растворяли в метиленхлориде (2 мл) и перемешивали с безводным сульфатом натрия при комнатной температуре в течение 3 ч. Метиленхлоридный раствор декантировали в реакционной колбе и промывали сульфат натрия дополнительным количеством метиленхлорида (2 мл). К раствору добавляли (1-метил-2-нитро-1H-имидазол-5-ил)метанол (115 мг, 0,732 ммоль, полученный способом, описанным в патенте США 8003625 B2) и трифенилфосфин (211 мг, 0,805 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до получения раствора. Затем раствор охлаждали на ледяной бане и обрабатывали диизопропилазодикарбоксилатом, DIAD (158 мкл, 0,805 ммоль). Через 1 ч снимали с ледяной бани и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Сырой продукт очищали на колонке с силикагелем для выделения продукта, смешанного с трифенилфосфиноксидом. Твердые вещества растирали с трет-бутилметилловым эфиром

для удаления оксида трифенилфосфина с получением 5-[(2,4-динитрофенокси)метил]-1-метил-2-нитро-1H-имидазола (70 мг, 0,236 ммоль, выход 30%).

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 8,80 (d, J=2,4 Hz, 1H), 8,58 (dd, J=9,6, 2,4 Hz, 1H); δ 7,82 (D, J=9,6 Hz, 1H), 7,40 (s, 1H), 5,66 (s, 2H), 3,95 (s, 3H). МС (ESI+) для C₁₁H₉N₅O₇ m/z 324,1 (M + H)⁺.

Пример 10. Оценка ингибирующего действия Соединения А на панели линии опухолевых клеток NCI-60.

Линии опухолевых клеток человека панели скрининга рака выращивали в среде RPMI 1640, содержащей 5% фетальной бычьей сыворотки и 2 мМ L-глутамин. Для типичного скринингового теста клетки инокулировали в 96-луночные планшеты для микротитрования в 100 мкл при плотностях посева от 5000 до 40000 клеток/лунку в зависимости от времени удвоения отдельных клеточных линий. После инокуляции клеток планшеты для микротитрования инкубировали при 37°C, 5% CO₂, 95% воздуха и 100% относительной влажности в течение 24 ч перед добавлением экспериментальных препаратов.

Через 24 ч два планшета каждой клеточной линии фиксировали *in situ* с помощью ТСА с целью измерения клеточной популяции для каждой клеточной линии во время добавления лекарственного препарата (Tz). Экспериментальные препараты солибилизировали в диметилсульфоксиде до 400-кратной требуемой конечной максимальной тестовой концентрации и хранили в замороженном виде перед применением. Во время добавления лекарственного средства аликвоту замороженного концентрата размораживали и разбавляли до двукратной требуемой конечной максимальной тестовой концентрации полной средой, содержащей 50 мкг/мл гентамицина. Аликвоты 100 мкл разбавленного лекарственного средства добавляли в соответствующие лунки для микротитрования, уже содержавшие 100 мкл среды, что обеспечивало требуемую конечную концентрацию лекарственного средства.

После добавления лекарственного средства планшеты инкубировали в течение дополнительных 48 ч при 37°C, 5% CO₂, 95% воздуха и 100% относительной влажности. Для адгезивных клеток анализ завершали путем добавления холодной ТСА. Клетки фиксировали *in situ* путем осторожного добавления 50 мкл холодной 50% (мас./об.) ТСА (конечная концентрация, 10% ТСА) и инкубировали в течение 60 мин при 4°C. Супернатант удаляли, а планшеты промывали пять раз водопроводной водой и сушили на воздухе. Раствор сульфородамина В (SRB) (100 мкл) с концентрацией 0,4% (мас./об.) в 1%-ной уксусной кислоте добавляли в каждую лунку и инкубировали планшеты в течение 10 мин при комнатной температуре. После окрашивания несвязанный краситель удаляли путем пятикратного промывания 1%-ной уксусной кислотой и сушили планшеты на воздухе. Связанный краситель затем солибилизировали с помощью 10 мМ основания Trizma, поглощение считывали на автоматическом планшет-ридере при длине волны 515 нм. Для суспензионных клеток использовали ту же методику, за исключением того, что анализ прекращали путем фиксации осевших клеток на дне лунок при осторожном добавлении 50 мкл 80% ТСА (конечная концентрация, 16% ТСА). Используя семь измерений поглощения [время ноль, (Tz), контрольный рост (C) и тестовый рост в присутствии лекарственного средства при пяти уровнях концентрации (Ti)], рассчитывали процент роста для каждого уровня концентрации лекарственного средства. Процент ингибирования роста рассчитывали как:

$$[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100 \text{ для концентраций, для которых } Ti \geq Tz >$$

$$[(Ti-Tz)/Tz] \times 100 \text{ для концентраций, для которых } Ti < Tz.$$

Данные однократной дозы представлены в виде среднего графика процента роста подвергнутых лечению клеток. Указанное число представляет собой рост относительно контроля без лекарственного средства и относительно количества клеток на начало отсчета времени. Это позволяет обнаруживать ингибирование роста (значения от 0 до 100), а также летальность (значения менее 0).

В NCI-60 для Соединения А средний процент роста по сравнению с контролем составил 98,63 с дельтой 26,47% для всех протестированных клеточных линий и диапазоном 40,14%. Аналогично DNP имел средний процент роста контроля 98,4% с дельтой 28,44 для всех протестированных клеточных линиях с диапазоном 44,43%.

Результаты для каждой клеточной линии представлены ниже. Соединение А и DNP не вызывали сильного ингибирования роста (по меньшей мере 50%) при 10 мкМ в любой из клеточных линий NCI-60. На фиг. 29 представлен рост клеток клеточных линий NCI-60, подвергнутых лечению Соединением А или DNP при 10 мкМ.

Пример 11. Образование DNP из Соединения А в микросомах печени.

Стадия 1: Раствор готовили в соответствии с табл. 4.

Таблица 4. Приготовление маточного раствора

Реагент	Исходная концентрация	Объем	Конечная концентрация
Фосфатный буфер	200 мМ	200 мкл	100 мМ
Особо чистая H ₂ O	-	106 мкл	-
Раствор MgCl ₂	50 мМ	40 мкл	5 мМ
Микросомы	(20 мг/мл)	10 мкл	0,5 мг/мл

Стадия 2: 40 мкл 10 мМ раствора NADPH добавляли в каждую лунку. Конечные концентрации NADPH составляли 1 мМ. Смесь предварительно нагревали при 37°C в течение 5 мин. Отрицательные контрольные образцы готовили путем замены растворов NADPH на 40 мкл особо чистой H₂O. Отрицательный контроль использовали для исключения некорректного показателя, вызванного нестабильностью химического вещества. Образцы с NADPH готовили в двух экземплярах. Отрицательные контроли готовили в единственном экземпляре (см. фиг. 30, Образование DNP из 2 мкМ Соединения А в микросомах печени разных видов). Источник получения тестируемых видов приведен в табл. 5.

Таблица 5. Информация о микросомах печени

Вид	Номер в каталоге	Номер партии	Штамм и пол	Поставщик
Человек	452117	38291	Объединенный, самцы и самки	Corning
Крыса	452501	62547	Объединенные, самец Sprague-Dawley	Corning
Мышь	452701	4133003	Объединенный, самец CD-1	Corning
Обезьяна (цино)	-	ZDD	Объединенный, самец Cynomolgus	RILD (Шанхай)
Собака	D1000	1310086	Объединенный, самец бигль	Xenotech

Стадия 3: Реакцию начинали путем добавления 4 мкл 200 мкМ растворов контрольного соединения или тестируемого соединения. В качестве положительного контроля в данном исследовании использовали верапамил. Конечная концентрация тестируемого соединения или контрольного соединения составляла 2 мкМ.

Стадия 4: Аликвоты 50 мкл отбирали из реакционного раствора через 0, 15, 30, 45 и 60 мин. Реакцию останавливали путем добавления 4 объемов холодного метанола с IS (200 нМ имипрамина, 200 нМ лабеталола и 2 мкМ кетопрофена). Образцы центрифугировали при 3220 g в течение 40 мин. Аликвоту 90 мкл супернатанта смешивали с 90 мкл особо чистой H₂O и затем использовали для анализа ЖХ-МС/МС.

Стадия 5: Анализ данных

Все расчеты проводили с использованием Microsoft Excel.

Площади пиков определяли на экстрагированных ионных хроматограммах.

Значение наклона к определяли с помощью линейной регрессии натурального логарифма оставшегося процента от исходного лекарственного средства на кривой времени инкубации.

Результаты показывают, что образование DNP осуществимо между видами и легко происходит с помощью общих ферментов печени.

Пример 12. Предложенные критерии включения в фазу 1/2 клинических испытаний

Критерии включения 2-3 маркера метаболического синдрома 10% жира в печени ALT 40 или выше FIB4 более 1,1

Критерии исключения: BMI <25, употребление алкоголя

В анамнезе синусовая тахикардия, ишемическая болезнь или дисфункция почек

Предельные значения исследуемых показателей эффективности, полученных на стадии исследования 1/2

Количественное определение содержания жира в печени с использованием MRI-PDFF и MRE

Циркулирующий СК18

Неинвазивный дыхательный тест для оценки активности митохондрий печени (BreathID® System, Exalenz Biosciences)

Проверка воздействия на мишень и PD ID респондента и стратификация пациента

Быстрая валидация заданных параметров

Систему BreathID® использовали в нескольких исследованиях фазы II NASH (NCT02314026, NCT01244503, NCT01281059).

Пример 13. Синтез 1-[2-(2,4-динитрофенокси)этил]-2-метил-5-нитро-1H-имидазола (Соединение № 1 в табл. А).



2,4-динитрофенол (смоченный примерно 20% воды) (масса во влажном состоянии 269 мг, масса в сухом состоянии 215 мг, 1,17 ммоль) растворяли в метилхлориде (2 мл) и перемешивали с безводным

сульфатом натрия при комнатной температуре в течение 3 ч. Метиленхлоридный раствор декантировали в реакционной колбе и промывали сульфат натрия дополнительным количеством метиленхлорида (2 мл). К раствору добавляли 2-(2-метил-5-нитроимидазол-1-ил)этанол (125 мг, 0,732 ммоль) и трифенилфосфин (211 мг, 0,805 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до получения раствора. Затем раствор охлаждали на ледяной бане и обрабатывали диизопропилазодикарбоксилатом, DIAD (158 мкл, 0,805 ммоль). Через 1 ч снимали с ледяной бани и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Сырой продукт очищали на колонке с силикагелем для выделения продукта, смешанного с трифенилфосфиноксидом. Твердые вещества растирали с трет-бутилметилловым эфиром для удаления оксида трифенилфосфина с получением 1-[2-(2,4-динитрофенокси)этил]-2-метил-5-нитро-1H-имидазола. МС (ESI+) для $C_{12}H_{11}N_5O_7$ m/z 338,1 (M + H)⁺.

Пример 14. Синтез 1-метил-2-нитро-5-[(4-нитрофенокси)метил]-1H-имидазола (Соединение № 3 в табл. А).



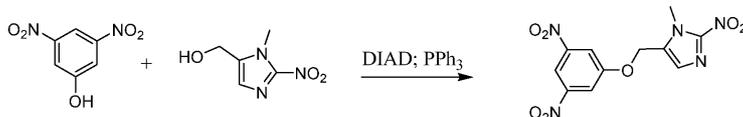
4-Нитрофенол (162 мг, 1,17 ммоль) растворяли в метиленхлориде (2 мл). К раствору добавляли (3-метил-2-нитро-3H-имидазол-4-ил)метанол (115 мг, 0,732 ммоль) и трифенилфосфин (211 мг, 0,805 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до получения раствора. Затем раствор охлаждали на ледяной бане и обрабатывали диизопропилазодикарбоксилатом, DIAD (158 мкл, 0,805 ммоль). Через 1 ч снимали с ледяной бани и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Сырой продукт очищали на колонке с силикагелем для выделения продукта, смешанного с трифенилфосфиноксидом. Твердые вещества растирали с трет-бутилметилловым эфиром для удаления оксида трифенилфосфина с получением 1-метил-2-нитро-5-[(4-нитрофенокси)метил]-1H-имидазола. МС (ESI+) для $C_{11}H_{10}N_4O_5$ m/z 279,1 (M + H)⁺.

Пример 15. Синтез 1-Метил-2-нитро-5-[(3-нитрофенокси)метил]-1H-имидазола (Соединение № 4 в табл. А).



3-Нитрофенол (162 мг, 1,17 ммоль) растворяли в метиленхлориде (2 мл). К раствору добавляли (3-метил-2-нитро-3H-имидазол-4-ил)метанол (115 мг, 0,732 ммоль) и трифенилфосфин (211 мг, 0,805 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до получения раствора. Затем раствор охлаждали на ледяной бане и обрабатывали диизопропилазодикарбоксилатом, DIAD (158 мкл, 0,805 ммоль). Через 1 ч снимали с ледяной бани и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Сырой продукт очищали на колонке с силикагелем для выделения продукта, смешанного с трифенилфосфиноксидом. Твердые вещества растирали с трет-бутилметилловым эфиром для удаления оксида трифенилфосфина с получением 1-метил-2-нитро-5-[(3-нитрофенокси)метил]-1H-имидазола. МС (ESI+) для $C_{11}H_{10}N_4O_5$ m/z 279,1 (M + H)⁺.

Пример 16. Синтез 5-[(3,5-динитрофенокси)метил]-1-метил-2-нитро-1H-имидазола (Соединение № 5 в табл. А).



3,5-Динитрофенол (215 мг, 1,17 ммоль) растворяли в метиленхлориде (2 мл). К раствору добавляли (3-метил-2-нитро-3H-имидазол-4-ил)метанол (115 мг, 0,732 ммоль) и трифенилфосфин (211 мг, 0,805 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до получения раствора. Затем раствор охлаждали на ледяной бане и обрабатывали диизопропилазодикарбоксилатом, DIAD (158 мкл, 0,805 ммоль). Через 1 ч снимали с ледяной бани и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Сырой продукт очищали на колонке с силикагелем для выделения продукта, смешанного с трифенилфосфиноксидом. Твердые вещества растирали с трет-бутилметилловым эфиром для удаления оксида трифенилфосфина с получением 5-[(3,5-динитрофенокси)метил]-1-метил-2-нитро-1H-имидазола.

МС (ESI+) для $C_{11}H_9N_5O_7$ m/z 324,1 (M+H)⁺.

Пример 17. Синтез 5-[(2,4-дихлорфенокси)метил]-1-метил-2-нитро-1H-имидазола (Соединение № 6 в табл. А).

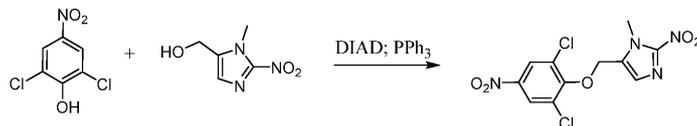


2,4-Дихлорфенол (190 мг, 1,17 ммоль) растворяли в метиленхлориде (2 мл). К раствору добавляли

(3-метил-2-нитро-3Н-имидазол-4-ил)метанол (115 мг, 0,732 ммоль) и трифенилфосфин (211 мг, 0,805 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до получения раствора. Затем раствор охлаждали на ледяной бане и обрабатывали диизопропилазодикарбоксилатом, DIAD (158 мкл, 0,805 ммоль). Через 1 ч снимали с ледяной бани и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Сырой продукт очищали на колонке с силикагелем для выделения продукта, смешанного с трифенилфосфиноксидом. Твердые вещества растирали с трет-бутилметилловым эфиром для удаления оксида трифенилфосфина с получением 5-[(2,4-дихлорфенокси)метил]-1-метил-2-нитро-1Н-имидазола.

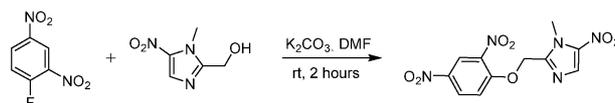
МС (ESI+) для $C_{11}H_9Cl_2N_3O_3$ m/z 301,1 (M+H)⁺.

Пример 18. Синтез 5-[(2,6-дихлор-4-нитрофенокси)метил]-1-метил-2-нитро-1Н-имидазола (Соединение № 8 в табл. А).



2,6-Дихлор-4-нитрофенол (243 мг, 1,17 ммоль) растворяли в метиленхлориде (2 мл). К раствору добавляли (3-метил-2-нитро-3Н-имидазол-4-ил)метанол (115 мг, 0,732 ммоль) и трифенилфосфин (211 мг, 0,805 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до получения раствора. Затем раствор охлаждали на ледяной бане и обрабатывали диизопропилазодикарбоксилатом, DIAD (158 мкл, 0,805 ммоль). Через 1 ч снимали с ледяной бани и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Сырой продукт очищали на колонке с силикагелем для выделения продукта, смешанного с трифенилфосфиноксидом. Твердые вещества растирали с трет-бутилметилловым эфиром для удаления оксида трифенилфосфина с получением 5-[(2,6-дихлор-4-нитрофенокси)метил]-1-метил-2-нитро-1Н-имидазола. МС (ESI+) для $C_{11}H_8Cl_2N_4O_5$ m/z 347,0 (M+H)⁺.

Пример 19. Синтез 2-[(2,4-динитрофенокси)метил]-1-метил-5-нитро-1Н-имидазола (Соединение № 16 в табл. А).



Смесь (1-метил-5-нитро-1Н-имидазол-2-ил)метанола (176 мг, 1,12 ммоль) и 1-фтор-2,4-динитробензола (250 мг, 1,34 ммоль) и K_2CO_3 (465 мг, 3,36 ммоль) в DMF (5 мл) перемешивали в течение 2 ч при температуре окружающей среды. Продукт реакции выделяли путем экстракции. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ в следующих условиях. Колонка: препаративная колонка XBridge C18 OBD 19 × 150 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: вода (10 ммоль/л NH_4HCO_3), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 20 мл/мин; градиентное элюирование. Фракции, содержащие продукт, собирали и затем лиофилизировали с получением 2-[(2,4-динитрофенокси)метил]-1-метил-5-нитро-1Н-имидазола в виде твердого вещества желтого цвета. ЖХ-МС:(ES, m/z) 324. (M+H)⁺.

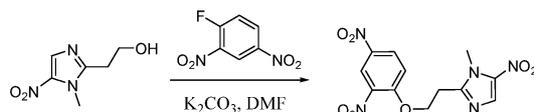
¹H-NMR: (400 МГц, DMSO-d₆) δ 8,79 (d, J=2,8 Hz, 1H), 8,57 (dd, J₁=2,8 Hz, J₂=9,2 Hz, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,79 (d, J=9,6 Hz, 1H), 5,72 (s, 2H), 3,95 (s, 3H); анализ: C, 42,79; H, 3,43; N, 20,68; O, 33,25.

Образование DNP из Соединения В микросомах печени

В соответствии с методикой эксперимента, описанной в примере 11, без изменения условий эксперимента, но с заменой Соединения А на указанное в заглавии соединение в ферменте человека, получили следующие результаты:

Вид	Структура анализа	Образование DNP (мкМ)					Процент образования (%)				
		0 мин.	15 мин.	30 мин.	45 мин.	60 мин.	0 мин.	15 мин.	30 мин.	45 мин.	60 мин.
Человек	С NADPH	0,031	0,038	0,025	0,023	0,018	1,56	1,90	1,26	1,13	0,91
	Без NADPH	0,017	0,015	0,014	0,014	0,013	0,83	0,75	0,72	0,69	0,63

Пример 20. Синтез 2-[2-(2,4-динитрофенокси)этил]-1-метил-5-нитро-1Н-имидазола (Соединение № 17 в табл. А).



Смесь 2-(1-метил-5-нитро-1Н-имидазол-2-ил)этанола (1,32 ммоль) и 1-фтор-2,4-динитробензола (1,65 ммоль) и K_2CO_3 (465 мг, 3,36 ммоль) в ДМФ (DMF) (5 мл) перемешивали в течение 2 ч при температуре окружающей среды. Продукт реакции выделяли путем экстракции. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ в следующих условиях. Колонка: препаративная колонка XBridge C18 OBD 19 × 150 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: вода (10 ммоль/л NH_4HCO_3), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 20 мл/мин; градиентное элюирование. Содержащие продукт фракции собирали и затем лиофилизировали с

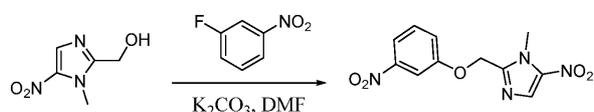
получением 2-[2-(2,4-динитрофенокси)этил]-1-метил-5-нитро-1H-имидазола. ЖХ-МС: (ES, m/z) 338,07 (M+H)⁺; анализ: С, 42,62; Н, 3,20; N, 20,83; O, 33,32.

Пример 21. Синтез 1-метил-5-нитро-2-[(4-нитрофенокси)метил]-1H-имидазола (Соединение № 18 в табл. А).



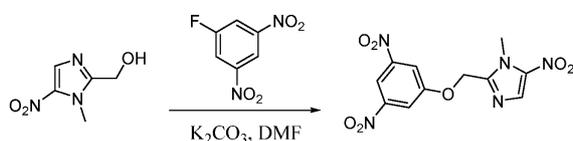
Смесь 2-(1-метил-5-нитро-1H-имидазол-2-ил)этанол (1,24 ммоль) и 1-фтор-4-нитробензола (1,45 ммоль) и K₂CO₃ (465 мг, 3,36 ммоль) в DMF (5 мл) перемешивали в течение 2 чв при температуре окружающей среды, после чего нагревали. Продукт реакции выделяли путем экстракции. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ в следующих условиях. Колонка: препаративная колонка XBridge C18 OBD 19 × 150 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: вода (10 ммоль/л NH₄HCO₃), подвижная фаза В: ACN (ацетонитрил); скорость потока: 20 мл/мин; градиентное элюирование. Фракции, содержащие продукт, собирали и затем лиофилизировали с получением 1-метил-5-нитро-2-[(4-Нитрофенокси)метил]-1H-имидазола. ЖХ-МС: (ES, m/z) 279,07 (M+H)⁺; анализ: С, 47,35; Н, 3,71; N,20,24; O, 28,82.

Пример 22. Синтез 1-метил-5-нитро-2-[(3-нитрофенокси)метил]-1H-имидазола (Соединение № 19 в табл. А).



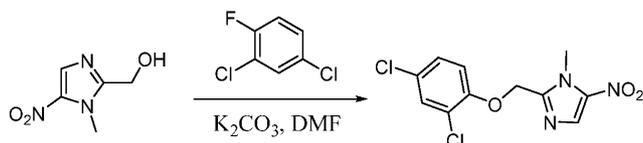
Смесь 2-(1-метил-5-нитро-1H-имидазол-2-ил)этанол (1,32 ммоль) и 1-фтор-3-нитробензола (1,67 ммоль) и K₂CO₃ (465 мг, 3,36 ммоль) в DMF (5 мл) перемешивали в течение 2 ч при температуре окружающей среды, после чего нагревали. Продукт реакции выделяли путем экстракции. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ в следующих условиях. Колонка: препаративная колонка XBridge C18 OBD 19 × 150 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: вода (10 ммоль/л NH₄HCO₃), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 20 мл/мин; градиентное элюирование. Фракции, содержащие продукт, собирали и затем лиофилизировали с получением 1-метил-5-нитро-2-[(3-нитрофенокси)метил]-1H-имидазола. ЖХ-МС: (ES, m/z) 279,07 (M+H)⁺; анализ:С, 47,53; Н, 3,69; N, 20,24; O, 28,85.

Пример 23. Синтез 2-[(3,5-динитрофенокси)метил]-1-метил-5-нитро-1H-имидазола (Соединение № 20 в табл. А).



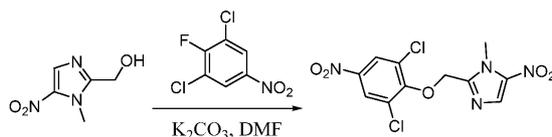
Смесь 2-(1-метил-5-нитро-1H-имидазол-2-ил)этанол (1,22 ммоль) и 3,5-динитро-1-фторбензола (1,54 ммоль) и K₂CO₃ (465 мг, 3,36 ммоль) в DMF (5 мл) перемешивали в течение 2 ч при температуре окружающей среды, после чего нагревали. Продукт реакции выделяли путем экстракции. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ в следующих условиях. Колонка: препаративная колонка XBridge C18 OBD 19 × 150 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: вода (10 ммоль/л NH₄HCO₃), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 20 мл/мин; градиентное элюирование. Фракции, содержащие продукт, собирали и затем лиофилизировали с получением 2-[(3,5-динитрофенокси)метил]-1-метил-5-нитро-1H-имидазола. ЖХ-МС: (ES, m/z) 324,05 (M+H)⁺; анализ: С, 40,90; Н, 2,89; N, 21,72; O, 34,60.

Пример 24. Синтез 2-[(2,4-дихлорфенокси)метил]-1-метил-5-нитро-1H-имидазола (Соединение № 21 в табл. А).



Смесь 2-(1-метил-5-нитро-1H-имидазол-2-ил)этанол (1,25 ммоль) и 2,4-дихлор-1-фторбензола (1,45 ммоль) и K₂CO₃ (465 мг, 3,36 ммоль) в DMF (5 мл) перемешивали в течение 2 ч при температуре окружающей среды, после чего нагревали. Продукт реакции выделяли путем экстракции. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ в следующих условиях. Колонка: препаративная колонка XBridge C18 OBD 19 × 150 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: вода (10 ммоль/л NH₄HCO₃), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 20 мл/мин; градиентное элюирование. Фракции, содержащие продукт, собирали и затем лиофилизировали с получением 2-[(2,4-дихлорфенокси)метил]-1-метил-5-нитро-1H-имидазола. ЖХ-МС: (ES, m/z) 302,00 (M+H)⁺; анализ: С, 43,78; Н, 3,08; Cl, 23,52; N, 13,81; O, 15,99.

Пример 25. Синтез 2-[(2,6-дихлор-4-нитрофенокси)метил]-1-метил-5-нитро-1H-имидазола (Соединение № 22 в табл. А).



Смесь 2-(1-метил-5-нитро-1H-имидазол-2-ил)этанола (1,15 ммоль) и 1,3-дихлор-2-фтор-5-нитробензола (1,24 ммоль) и K_2CO_3 (465 мг, 3,36 ммоль) в DMF (5 мл) перемешивали в течение 2 ч при температуре окружающей среды, после чего нагревали. Продукт реакции выделяли путем экстракции. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ в следующих условиях. Колонка: препаративная колонка XBridge C18 OBD 19 × 150 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: вода (10 ммоль/л NH_4HCO_3), подвижная фаза В: ACN; скорость потока: 20 мл/мин; градиентное элюирование. Фракции, содержащие продукт, собирали и затем лиофилизировали с получением 2-[(2,6-дихлор-4-нитрофенокси)метил]-1-метил-5-нитро-1H-имидазола. ЖХ-МС: (ES, m/z) 346. (M+H)⁺; анализ: С, 38,01; Н, 2,22; Cl, 20,13; N, 16,19; O, 23,15.

Пример 26. Синтез Соединений 11, 12, 13, 14 и 15 в табл. А.

В реакционном сосуде смесь соединения имидазола (1 молярный эквивалент), йодистого метилена (1 молярный эквивалент), калиевой соли фенольного соединения (1 молярный эквивалент), сухого триэтиламина (1 молярный эквивалент) и каталитического количества ТВАВ растворяли в сухом ацетонитриле. Раствор кипятили с обратным холодильником в течение 2 ч с последующим выпариванием растворителя. Затем остаток растворяли в $CHCl_3$ и промывали водой (2 × 200 мл). Органический слой сушили безводным сульфатом натрия, фильтровали и упаривали с получением сырого продукта. Дальнейшую очистку выполняли с помощью колоночной хроматографии на силикагеле.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. 5-[(2,4-Динитрофенокси)метил]-1-метил-2-нитро-1H-имидазол или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Способ лечения митохондриальных расстройств или состояний у млекопитающего, нуждающегося в этом, включающий введение млекопитающему эффективного количества соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли, где расстройство или состояние выбрано из ожирения, диабета, резистентности к инсулину или непереносимости инсулина, неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), стеатоза печени, дислипидемии, сердечно-сосудистого заболевания, болезни сердца или атеросклероза.

3. Способ по п.2, в котором расстройство представляет собой ожирение, диабет или резистентность к инсулину или непереносимость инсулина.

4. Способ по п.2, в котором расстройство представляет собой неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), стеатоз печени или диабет 2 типа (T2DM).

5. Способ по п.2, в котором расстройство представляет собой ожирение или избыток жира в организме.

6. Способ по п.2, в котором расстройство представляет собой дислипидемию.

7. Способ по п.2, в котором расстройство представляет собой сердечно-сосудистое заболевание.

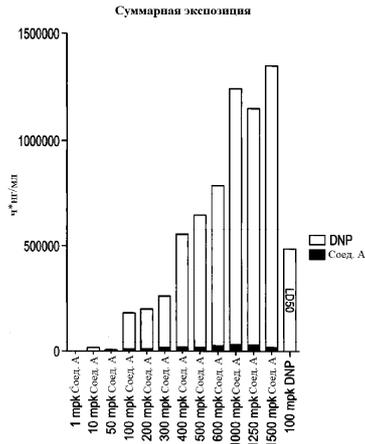
8. Способ по п.2, в котором расстройство представляет собой болезнь сердца.

9. Способ по п.2, в котором расстройство представляет собой атеросклероз.

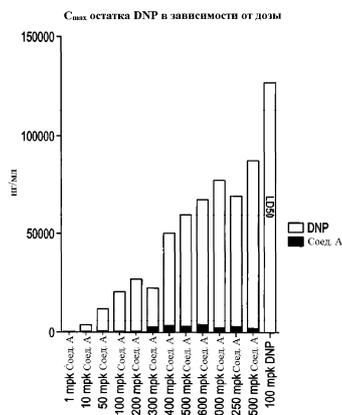
10. Способ снижения ожирения, контроля или предотвращения увеличения массы тела у млекопитающего, нуждающегося в этом, включающий введение млекопитающему эффективного количества соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли.

11. Способ лечения воспаления и фиброза, приводящего к неалкогольному стеатогепатиту (NASH), у млекопитающего, нуждающегося в этом, включающий введение млекопитающему эффективного количества соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли.

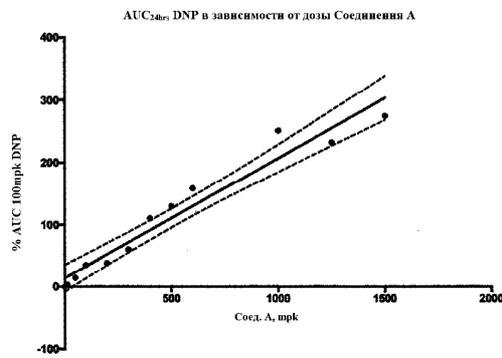
12. Фармацевтическая композиция для лечения митохондриальных расстройств или состояний у млекопитающего, нуждающегося в этом, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемую соль, где расстройство или состояние выбрано из ожирения, диабета, резистентности к инсулину или непереносимости инсулина, неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), стеатоза печени, дислипидемии, сердечно-сосудистого заболевания, болезни сердца или атеросклероза.



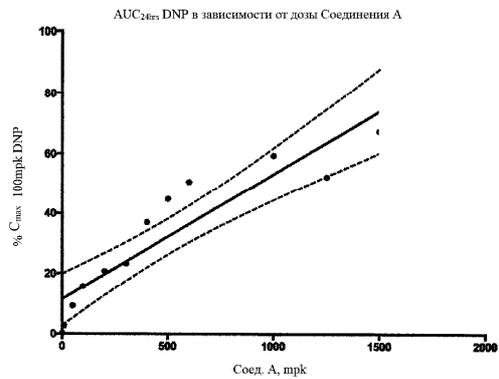
Фиг. 1



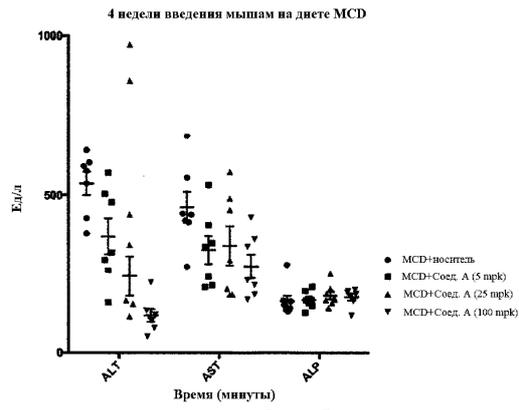
Фиг. 2



Фиг. 3

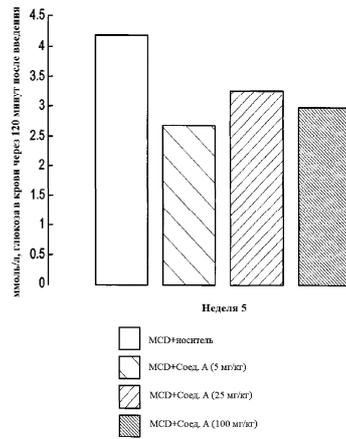


Фиг. 4



Фиг. 5

Повышение толерантности к глюкозе при лечении Соед. А



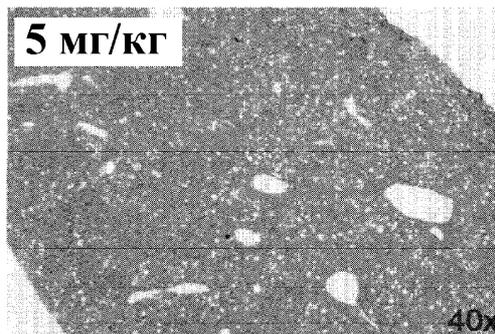
Фиг. 6

Оценка эффекта Соед. А на жировой модели NASH, индуцированной диетой MCD



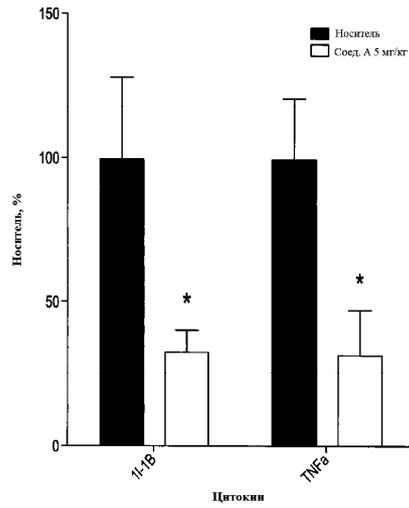
Фиг. 7

Сохранение стеногенеза и воспалительных изменений в печени мышей с NASH, индуцированной диетой MCD, при лечении Соед. А. Липидные капли уменьшились через 6 недель лечения.



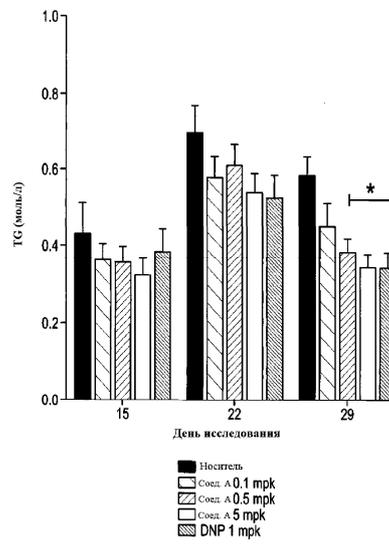
Фиг. 8

Уменьшение TNFα и IL-1β в печени



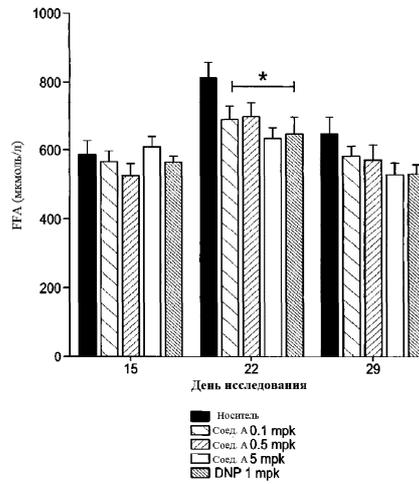
Фиг. 9

Уровень TG в сыворотке в исследуемых группах

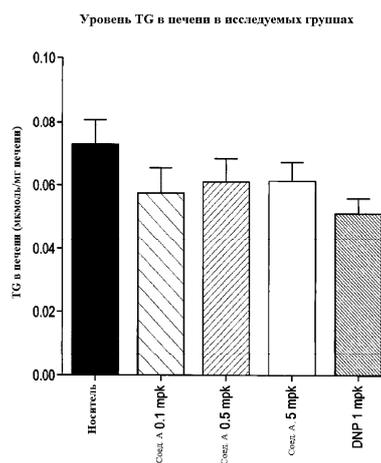


Фиг. 10

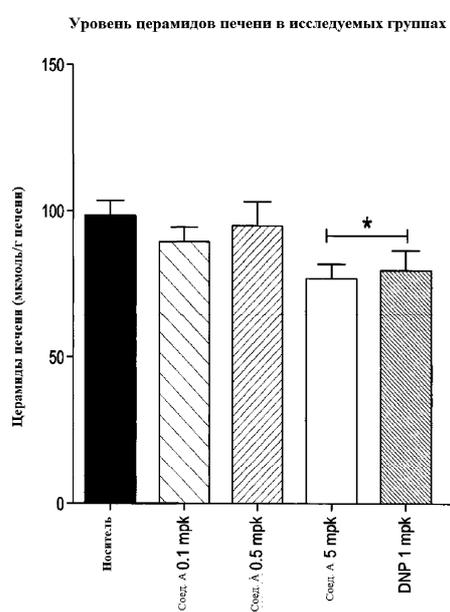
Уровень FFA в сыворотке в исследуемых группах



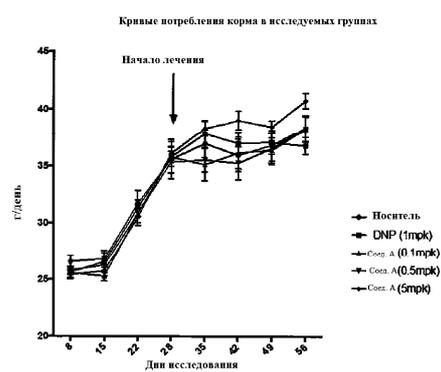
Фиг. 11



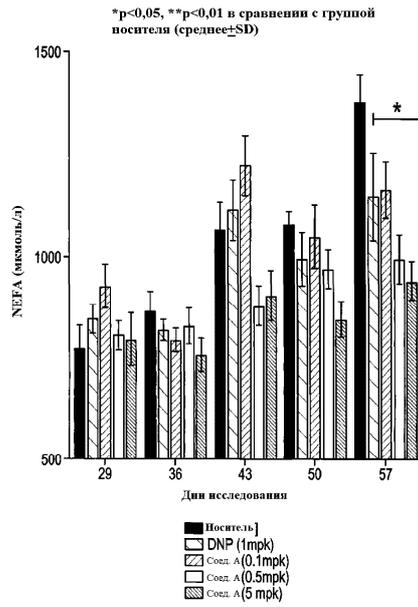
Фиг. 12



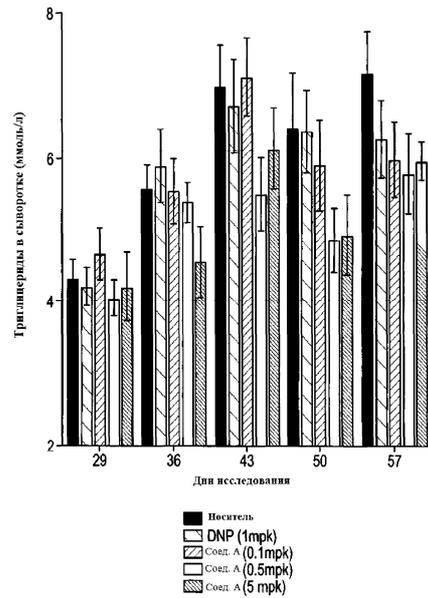
Фиг. 13



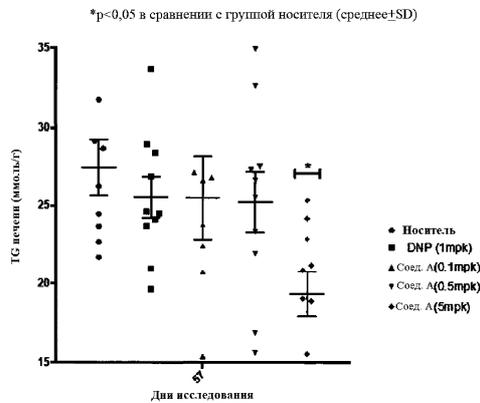
Фиг. 14



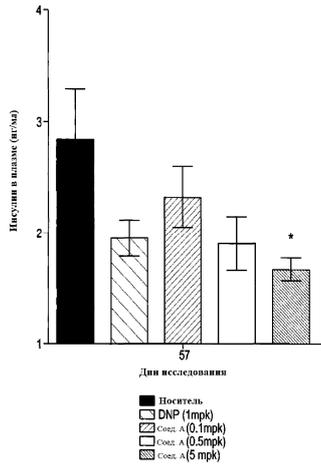
Фиг. 15



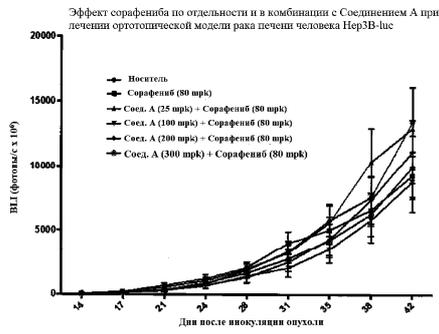
Фиг. 16



Фиг. 17

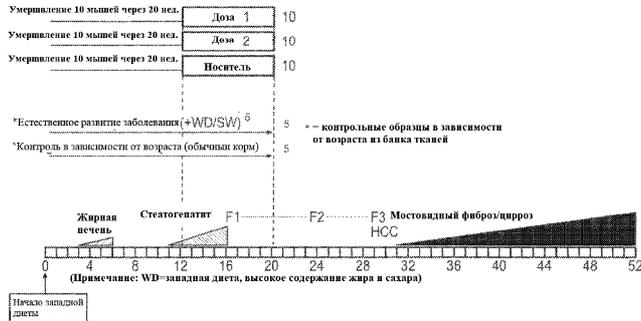


Фиг. 18

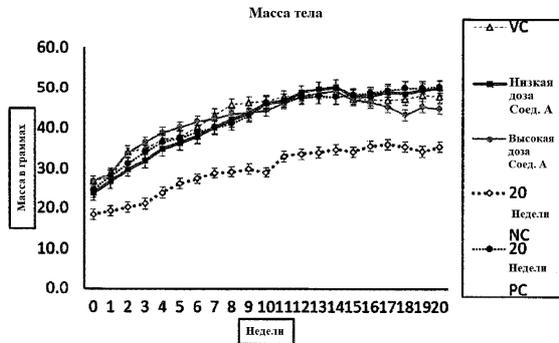


Фиг. 19

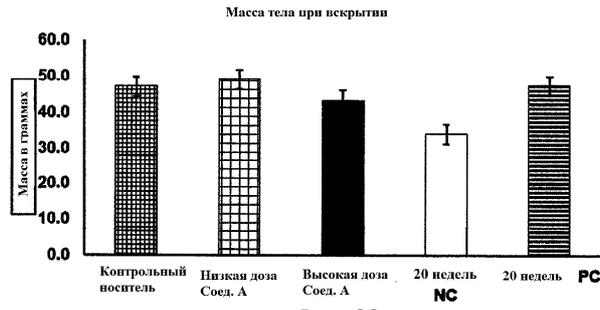
Эффект Соед. А в модели диет-индуцированной неалкогольной жировой болезни печени у животных



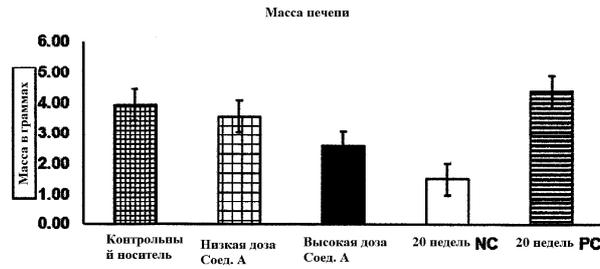
Фиг. 20



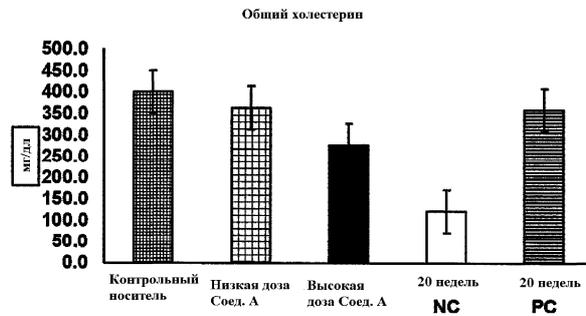
Фиг. 21



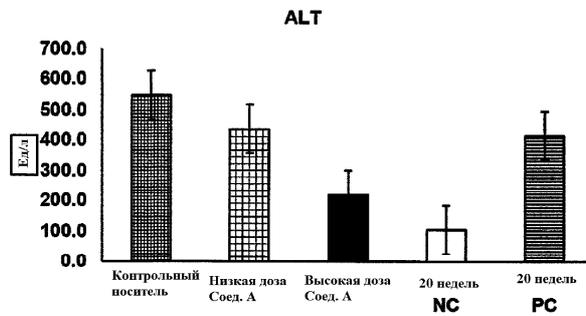
Фиг. 22



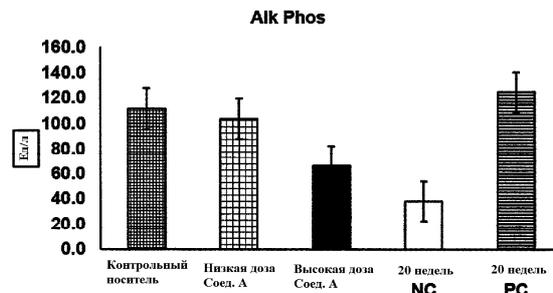
Фиг. 23



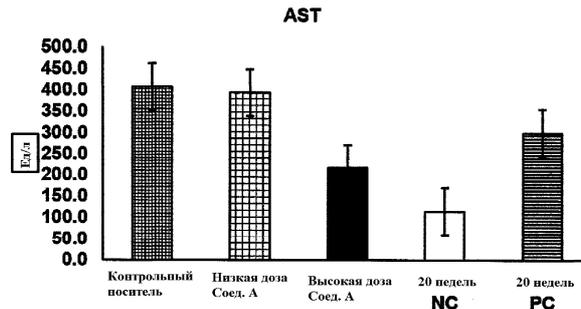
Фиг. 24



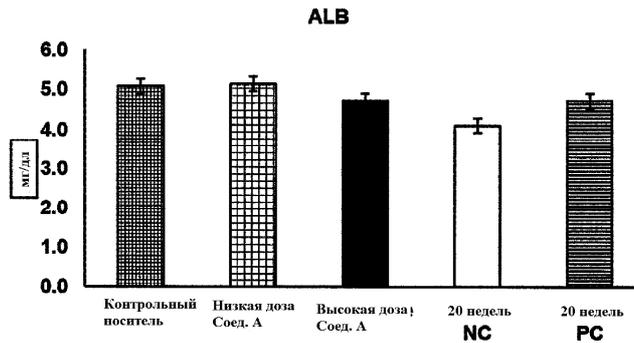
Фиг. 25



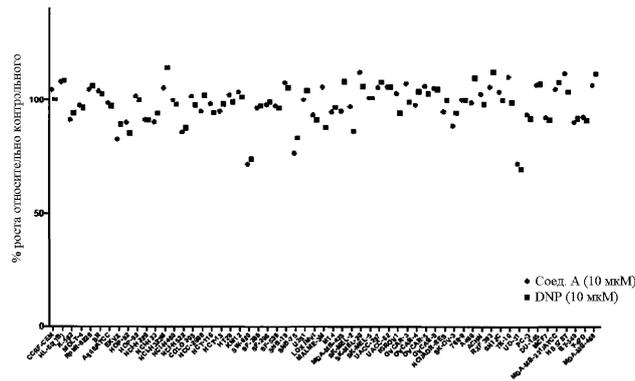
Фиг. 26



Фиг. 27

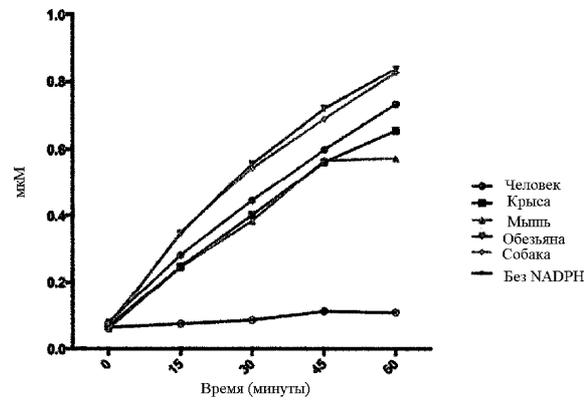


Фиг. 28

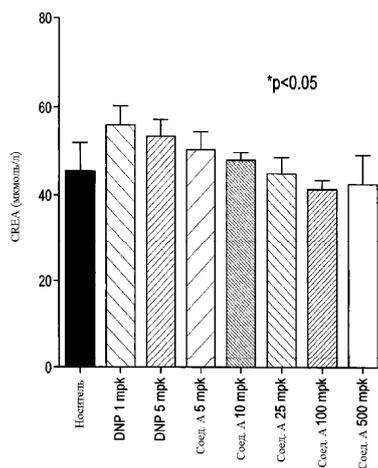


Фиг. 29

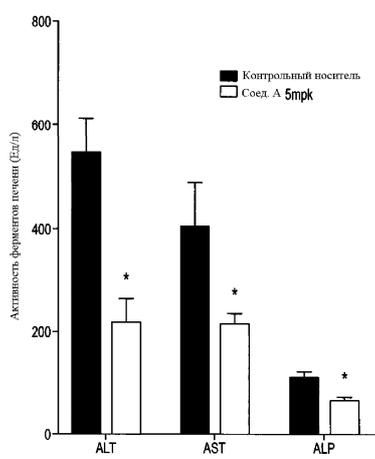
Образование DNP из 2 мкМ Соединения А в микросомах печени разных видов



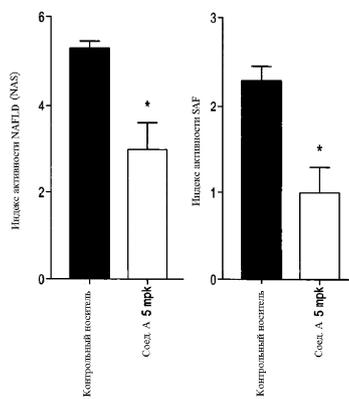
Фиг. 30



Фиг. 31



Фиг. 32



Фиг. 33

