

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202290538 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.05.18(22) Дата подачи заявки  
2020.08.14(51) Int. Cl. A61P 21/00 (2006.01)  
C07D 311/16 (2006.01)  
C07D 405/12 (2006.01)  
C07D 409/12 (2006.01)  
A61K 31/352 (2006.01)

## (54) СОЕДИНЕНИЯ, ПОДХОДЯЩИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ИСТОЩЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ И ДРУГИХ СОСТОЯНИЙ

(31) 19192107.1

(32) 2019.08.16

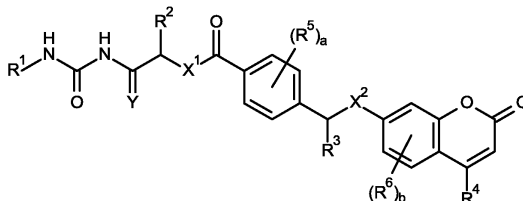
(33) EP

(86) PCT/EP2020/072911

(87) WO 2021/032643 2021.02.25

(71)(72) Заявитель и изобретатель:  
АДАМС ФОЛЬКЕР; ЛАБАЙТ  
ЗИГФРИД (DE)(74) Представитель:  
Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,  
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов  
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,  
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к соединению общей формулы I



и его фармацевтически приемлемым солям; где переменные имеют значения, как определено в пунктах формулы и в описании. Изобретение также относится к соединениям формулы I для применения для лечения или профилактики состояний истощения мышечной ткани, атрофии скелетных или сердечных мышц, состояний, в особенности миопатий, которые связаны с увеличенной экспрессией Muscle RING Finger 1 (MuRF1) и других состояний; к соединениям формулы I для применения в качестве лекарственного средства; к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно соединение формулы I, и к способу лечения указанного состояния.

A1

202290538

202290538

A1

## СОЕДИНЕНИЯ, ПОДХОДЯЩИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ИСТОЩЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ И ДРУГИХ СОСТОЯНИЙ

5

Предпосылки создания изобретения

Настоящее изобретение относится к новым замещенным соединениям 4-[2-оксо-хромен-7-ил]гетерометил]бензойной кислоты, в особенности, к соединениям общей формулы I, как описано в настоящей заявке. Соединения  
10 обладают различными терапевтическими свойствами и пригодны для лечения и для профилактики состояний истощения мышечной ткани, а также для лечения или предотвращения миопатий, в особенности, для таких, которые связаны с увеличенной экспрессией Muscle RING Finger 1 (MuRF1).

Истощение мышечной ткани и мышечная слабость являются тяжелым  
15 осложнением, наблюдаемым при различных клинических состояниях, включая сердечную кахексию, инфаркт миокарда, гипертонию, злокачественное новообразование, лечение злокачественного новообразования определенными лекарственными средствами, диабет, заболевания почек и почечную недостаточность, генетическую мышечную атрофию и тяжелые инфекции, но  
20 также и при тяжелых физических состояниях, которые не связаны со специфическим заболеванием, таких как иммобилизация, длительная искусственная вентиляция легких, продолжительное состояние невесомости или старость. Истощение мышечной ткани характеризуется потерей мышечной массы, которая встречается как в конечностях, так и в дыхательных мышцах.  
25 Истощение мышечной ткани типично приводит к обострению симптомов и прогноза и продлевает период выздоровления.

Механизм, лежащий в основе истощения мышечной ткани, еще до конца не изучен. Известно, что истощение мышечной ткани включает активацию так  
30 называемых атрогинов, которые усиливают деградацию мышечных белков через аутофагосому и систему убиквитин-протеасома (UPS).

К сожалению, известно лишь несколько надежных стратегий, которые блокируют потерю мышечных белков, инициированную вышеупомянутыми клиническими состояниями, например, физической нагрузкой. Эти известные

стратегии обычно нацелены на подавление или инактивацию экспрессии атрогинов и/или ингибирование их убиквитилирующей активности.

В WO2015/010107 A1, например, описано применение небольших молекул для уменьшения мышечной слабости и/или истощения мышечной ткани и/или кахексии путем ингибирования фосфорилирования тирозина, индуцированное воспалительным цитокином (IL-6-индуцированное) Передатчика Сигнала и Активатора Транскрипции 3 (Stat 3). Ингибирование фосфорилирования Stat 3 предотвращает увеличение экспрессии миостатина, который, как известно, блокирует рост мышц путем повышающей регуляции экспрессии специфических атрогинов.

Другой перспективной стратегией блокировки потери мышечных белков является ингибирование функции Muscle RING Finger 1 (MuRF1). MuRF1 представляет собой мышечно-специфическую убиквитин E3 лигазу, которая, как полагают, обеспечивает ключевой шаг в передаче мульти-убиквитинированных мышечных белков на систему убиквитин-протеасома для разложения. Ее экспрессия непосредственно связана с истощением мышечной ткани при различных клинических состояниях, в то время как инактивация ее гена придает частичную резистентность к состояниям истощения мышечной ткани. Многочисленные исследования, проведенные за последние 15 лет, показали, что многие заболевания, связанные с мышцами, то есть миопатии, такие как, например, миопатия критических состояний, немалиновая миопатия, хроническая воспалительная миопатия, миопатия вследствие диабета или легочной гипертензии, которые приводят к мышечной слабости, могут быть связаны с повышенной регуляцией MuRF1 экспрессии.

Hooijman и др., *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 2015, 191(10), 1126-1138, описали связь между экспрессией MuRF1 и потерей силы мышечных волокон диафрагмы и деградацией мышечных белков, обычно наблюдаемой у больных в критическом состоянии, находящихся на искусственной вентиляции легких (миопатия критических состояний). Они наблюдали, что эта потеря силы мышечных волокон ослабляется у MuRF1-КО мышей, находящихся на искусственной вентиляции легких, тем самым обнаруживая связь между миопатией критических состояний и экспрессией MuRF1.

Li и Granzier, *Hum. Mol. Genet.*, 15 сентября 2015 г., 24(18), 5219-5233, описали мышиную модель для немалиновой миопатии, в которых мышцы,

богатые гликолитическими волокнами, активизируют пути протеолиза, включая MuRF-1, и подвергаются гипотрофии, что приводит к уменьшению площади поперечного сечения (CSA), тем самым усугубляя их дефицит усилия. Следовательно, предполагают, что ингибирование MuRF1 защищает CSA мышечного волокна и усилие мышечного волокна при немалиновой миопатии, в особенности для типов мышц, богатых гликолитическими волокнами, таких как M. Quadriceps (четырёхглавая мышца).

Adams и др., *J. Mol. Biol.*, 2008, 384, 48–59, описали, что внутрибрюшинная инъекция фактора некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ) у C57Bl6 мышей уменьшает развитие силы камбаловидной мышцы при 150 Гц на 25%. Эта TNF- $\alpha$  индуцированная потеря мышечного усилия ослабляется у животных с нокаутом MuRF-1. Следовательно, предполагают, что ингибирование MuRF1 пригодно при состояниях хронического воспаления с повышенными уровнями TNF- $\alpha$ .

De Man и др., *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 15 мая 2011 г., 183(10), 1411-1418, описали, что CSA диафрагмальных волокон значительно меньше у крыс с легочной гипертензией (PH) по сравнению с контролями. В соответствии с данными, полученными на крысах, исследования на пациентах с PH обнаружили значительное снижение CSA и нарушение сократительной способности мышечных волокон диафрагмы по сравнению с контрольными субъектами. Они также обнаружили, что это уменьшение CSA диафрагмальных волокон связано с повышенной экспрессией E3-лигаз MAFbx и MuRF-1.

На сегодняшний день существует лишь ограниченное количество терапевтических подходов, направленных на ингибирование функции MuRF1.

Например, Castillero и др., *Metabolism*, 2013, 62, 1495-1502, описали аденовирусный нокдаун атрогин-1 и MuRF1, что предотвращает индуцированную дексаметазоном атрофию культивируемой мышечной трубочки L6s.

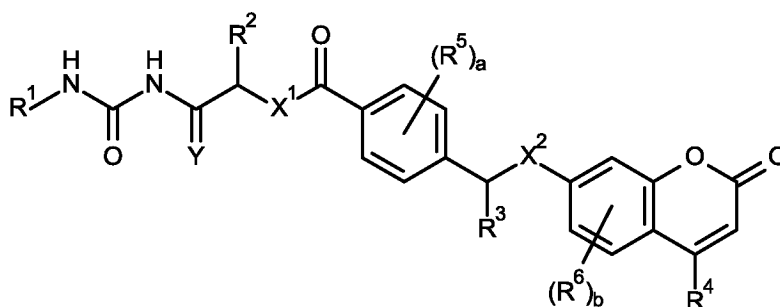
Eddins и др., *Cell Biochem. Biophys.*, 2011, 60, 113-118, описали нацеленное ингибирование убиквитилирование MuRF1 с помощью мышечно-специфической небольшой молекулы, что приводит к существенному уменьшению истощения мышечной ткани на моделях клеточной атрофии.

Несмотря на то, что эти терапевтические исследования указывают на то, что ингибирование функции MuRF1 с помощью небольших молекул может предотвращать атрофию в мышечных трубочках, этот подход еще не был

переведен в параметры *in vivo setting*, такие как клинические релевантные модели на животных. Следовательно, в данной области техники до настоящего времени существует практически неудовлетворенная потребность в обеспечении соединений и способов лечения и/или профилактики состояний истощения мышечной ткани.

#### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Задачей настоящего изобретения является обеспечение дополнительных небольших молекул, которые являются подходящими для применения для лечения и/или профилактики состояний истощения мышечной ткани или состояний, которые могут быть облегчены путем улучшения состояний мышц. Эта и другие задачи решаются с помощью соединений общей формулы I, описанных ниже, и их фармацевтически приемлемых солей:



(I)

15 где

$R^1$  представляет собой водород или группу  $-CH_2R^{1a}$ , где  $R^{1a}$  выбирают из группы, включающей водород,  $C_1$ - $C_3$ -алкил, фенил, где фенил не замещен или может нести 1, 2 или 3 радикала, независимо выбранных из группы, включающей галоген, циано,  $C_1$ - $C_3$ -алкил,  $C_1$ - $C_3$ -галоалкил и  $C_1$ - $C_3$ -алкокси; и 5-ти - 10-ти членное гетероароматическое кольцо, содержащее от 1 до 4 гетероатомов или гетеро-групп, независимо выбранных из группы, включающей N,  $NR^c$ , O и S в качестве кольцевого (ых) члена (ов), где 5-ти - 10-ти членное гетероароматическое кольцо не замещено или может нести 1, 2 или 3 радикала  $R^7$ ;

25  $R^2$  представляет собой водород, метил или фторированный метил;

$R^3$  представляет собой водород, метил или фторированный метил;

$R^4$  представляет собой водород или  $C_1$ - $C_4$ -алкил;

каждый  $R^5$  независимо выбирают из группы, включающей галоген, циано,  $C_1$ - $C_3$ -алкил,  $C_1$ - $C_3$ -галоалкил,  $C_1$ - $C_3$ -алкокси и  $C_1$ - $C_3$ -галоалкокси;

каждый  $R^6$  независимо выбирают из группы, включающей галоген, циано,  $C_1$ - $C_3$ -алкил,  $C_1$ - $C_3$ -галоалкил,  $C_1$ - $C_3$ -алкокси и  $C_1$ - $C_3$ -галоалкокси;

5 каждый  $R^7$  независимо выбирают из группы, включающей галоген, циано,  $C_1$ - $C_3$ -алкил,  $C_1$ - $C_3$ -галоалкил,  $C_1$ - $C_3$ -алкокси и  $C_1$ - $C_3$ -галоалкокси;

$X^1$  представляет собой  $NR^a$  или O;

$X^2$  представляет собой  $NR^b$ , O или S;

10 Y представляет собой атом кислорода (таким образом, что  $C=Y$  представляет собой  $C=O$ ) или два атома водорода (таким образом, что  $C=Y$  представляет собой  $CH_2$ );

$R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$  каждый независимо выбирают из группы, включающей водород и  $C_1$ - $C_4$ -алкил;

a представляет собой 0, 1, 2, 3 или 4; и

15 b представляет собой 0, 1, 2 или 3.

Таким образом, настоящее изобретение относится к соединениям общей формулы I и фармацевтически приемлемым солям соединений формулы I.

20 Учитывая фармакологические свойства соединений I, настоящее изобретение также относится к соединениям общей формулы I или их фармацевтически приемлемым солям для применения в качестве лекарственного средства.

Было обнаружено, что новые соединения способны смягчать истощение мышечной ткани и сократительные дисфункции на тестируемых клетках, а также в клинически релевантных животных моделях.

25 Таким образом, настоящее изобретение относится к соединениям общей формулы I или фармацевтически приемлемым солям соединений формулы I для применения для лечения или профилактики состояний истощения мышечной ткани.

30 Настоящее изобретение относится, в особенности, к соединениям общей формулы I или фармацевтически приемлемым солям соединений формулы I для применения для лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей в результате одного из следующих заболеваний или состояний: застойная сердечная недостаточность, хроническая сердечная недостаточность, злокачественное новообразование, лечение злокачественного

новообразования с применением миотоксических веществ, врожденная миопатия, СПИД, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), хронические заболевания почек, почечная недостаточность, диабет, тяжелые ожоги, саркопения при старении, снижение кровоснабжения, временная или  
5 длительная иммобилизация, длительная искусственная вентиляция легких, денервация, продолжительное состояние невесомости и недостаточность питания.

Кроме того, соединения согласно настоящему изобретению являются эффективными ингибиторами функции MuRF1 путем ингибирования активности  
10 убиквитин E3 лигазы MuRF1 и связывания MuRF1 с целевыми мышечными белками, такими как титин. Следовательно, настоящее изобретение также относится к соединениям общей формулы I или фармацевтически приемлемым солям соединений формулы I для применения для лечения или профилактики состояний, которые связаны с увеличенной экспрессией Muscle RING Finger 1  
15 (MuRF1), в особенности миопатий, которые связаны с повышенной экспрессией MuRF1.

Также было обнаружено, что соединения общей формулы I обладают благоприятным эффектом на кардиологические симптомы, связанные с систолической или диастолической дисфункцией, который непосредственно не  
20 связан с их влиянием на мышечные состояния. Таким образом, изобретение также относится к соединению общей формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для применения для лечения или профилактики кардиологических симптомов, связанных с систолической или диастолической дисфункцией.

Также было обнаружено, что соединения общей формулы I обладают благоприятным эффектом при диабете. Таким образом, изобретение также  
25 относится к соединению общей формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для применения для лечения или профилактики диабета, в особенности диабета II типа.

Изобретение также относится к лекарственному средству, содержащему по  
30 меньшей мере одно соединение формулы I, как описано в настоящей заявке, или по меньшей мере одну фармацевтически приемлемую соль соединения формулы I.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, включающей соединение, выбранное из соединений общей формулы I, как описано в настоящей заявке, или по меньшей мере одну его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

Изобретение также относится к применению соединений, выбранных из соединений общей формулы I, как определено в настоящей заявке, или их фармацевтически приемлемых солей для приготовления лекарственного средства для лечения или профилактики состояний истощения мышечной ткани; или для лечения или профилактики вышеперечисленных состояний или нарушений.

Изобретение также относится к способу лечения или предотвращения одного из вышеперечисленных состояний или нарушений, где указанный способ включает стадию введения соединения, выбранного из соединений общей формулы I, как определено в настоящей заявке, или их фармацевтически приемлемых солей, нуждающемуся в этом субъекту.

#### Подробное описание изобретения

Термины "соединение формулы I" и "соединения I" используются в качестве синонимов.

Термин "фармацевтически приемлемые соли" относится к катионным или анионным солям соединений, где противоион имеет происхождение из фармацевтически приемлемых нетоксических оснований или кислот, включая неорганические или органические основания и неорганические или органические кислоты. Следует принять во внимание, что, как используется в настоящей заявке, ссылки на соединения формулы I также охватывают фармацевтически приемлемые соли.

Если соединения формулы I являются щелочными, то соли могут быть приготовлены из фармацевтически приемлемых нетоксичных кислот, включая неорганические и органические кислоты. Такие фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот включают, но не ограничиваясь только ими, уксусную, трифторуксусную кислоту, бензолсульфоновую, бензойную, камфорсульфоновую, лимонную, этансульфоновую, фумаровую, глюконовую, глутаминовую, бромистоводородную, соляную, изэтионовую, молочную, малеиновую, яблочную, миндальную, метансульфоновую, муциновую, азотную,



памовую, пантотеновую, фосфорную, янтарную, серную, винную, *n*-толуолсульфоновую кислоту, и другие. Особенно предпочтительными являются лимонная, бромистоводородная, соляная, малеиновая, фосфорная, серная, фумаровая и винная кислоты.

5 Если соединения формулы I являются кислотными, то соли могут быть получены из фармацевтически приемлемых нетоксичных оснований, включая неорганические и органические основания. Фармацевтически приемлемые основные соли включают нетоксичные соли, имеющие происхождение из оснований, включая катионы металлов, такие как катион щелочного или  
10 щелочно-земельного металла, а также амины. Примеры подходящих катионов металлов включают литий, натрий, калий, магний, кальций, цинк и алюминий. Примеры подходящих аминов включают аргинин, N,N'-дибензилэтилендиамин, хлорпрокаин, холин, диэтиламин, диэтаноламин, дициклогексиламин, этилендиамин, глицин, лизин, N-метилглюкамин, оламин, 2-амино-2-  
15 гидроксиметил-пропан-1,3-диол и прокаин. Предпочтительными фармацевтически приемлемыми основными солями являются соли лития, натрия, калия, магния, кальция, цинка, алюминия и диэтанолamina.

Относительно обсуждения пригодных солей присоединения кислот и оснований, см., например, S. M. Berge и др., "Pharmaceutical Salts," 66 J. Pharm. ScL 1-19 (1977).

20 Термин "C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил" относится к метилу, этилу, *n*-пропилу, изопропилу, *n*-бутилу, *втор*-бутилу, изобутилу или *трет*-бутилу. Предпочтительно, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил выбирают из метила, этила, *n*-пропила, изопропила, в особенности из метила и этила.

25 Термин "C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкил" относится к метилу, этилу, *n*-пропилу или изопропилу. Предпочтительно, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкил выбирают из метила и этила, в особенности из метила.

Термин "галоген" относится к фтору, хлору, брому и йоду. Предпочтительно, галоген представляет собой фтор и хлор, в особенности фтор.

30 Термин "фторированный метил" относится к фторметилу, дифторметилу, трифторметилу, предпочтительно к трифторметилу.

Термин "фторированный метокси" относится к фторметокси, дифторметокси, трифторметокси, предпочтительно к трифторметокси.

Термин "C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкокси" относится к метокси, этокси, *n*-пропокси и изопропокси. Предпочтительно, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкокси выбирают из метокси и этокси, в особенности изметокси.

5 Термин "C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-галоалкил" относится к C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкильному радикалу, как определено выше, где по меньшей мере один из атомов водорода, например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 атомов водорода, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкильного радикала заменены атомом галогена, предпочтительно атомом хлора или фтора, в особенности атомом фтора. Примеры C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-галоалкила включают хлорметил, дихлорметил, трихлорметил, 2-хлорэтил, 2,2-дихлорэтил, 2,2,2-трихлорэтил, фторметил, 10 дифторметил, трифторметил, 2-фторэтил, 2,2-дифторэтил, 2,2,2-трифторэтил, 1-фторэтил, 1,1-дифторэтил, 1,1,2,2-тетрафторэтил, пентафторэтил и т.д. В особенности, "C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-галоалкил" выбирают из фторированного метила, как определено выше, и также из трихлорметила, 2,2,2-трихлорэтила, и 2,2,2-трифторэтила, в особенности из трифторметила.

15 Термин "C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-галоалкокси" относится к C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкокси радикалу, как определено выше, где по меньшей мере один из атомов водорода, например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 атомов водорода, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкокси радикала заменены атомом галогена, предпочтительно атомом хлора или фтора, в особенности атомом фтора. Примеры C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-галоалкокси включают хлорметокси, дихлорметокси, 20 трихлорметокси, 2-хлорэтокси, 2,2-дихлорэтокси, 2,2,2-трихлорэтокси, фторметокси, дифторметокси, трифторметокси, 2-фторэтокси, 2,2-дифторэтокси, 2,2,2-трифторэтокси, 1-фторэтокси, 1,1-дифторэтокси, 1,1,2,2-тетрафторэтокси, пентафторэтокси и т.д. В особенности, "C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-галоалкокси" выбирают из фторированного метокси, как определено выше, и также из трихлорметокси, 25 2,2,2-трихлорэтокси, и 2,2,2-трифторэтокси, в особенности из трифторметокси.

Термин "5-ти - 10-ти членное гетероароматическое кольцо" относится к 5-ти - 6-ти членному моноциклическому ароматическому кольцу или сопряженному 8-ти - 10-ти членному бициклическому ароматическому кольцу, где моноциклическое или бициклическое ароматическое кольцо содержит от 1 30 до 4 гетероатомов или гетеро-групп, независимо выбранных из группы, включающей N, NR<sup>c</sup>, O и S, где R<sup>c</sup> выбирают из группы, включающей водород и C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил. Примеры таких 5-ти - 6-ти членных моноциклических ароматических колец включают тиенил, фурил, пирролил, фуразанил, пиразолил, имидазолил, оксазолил, изооксазолил, тиазолил, изотиазолил, 1,2,3-триазолил,

1,2,4-триазолил, оксадиазолил, тиадиазолил, пиридил, пиримидил, пиридазинил, пиразинил, 1,2,4-триазинил, 1,3,6-триазинил и другие. Примеры таких 8-ти - 10-ти членных бициклических ароматических колец включают хинолинил, изохинолинил, имидазопиридил, хиназолинил, хиноксалинил, птеридинил, циннолинил, фталазинил, нафтиридинил, индолил, изоиндолил, азаиндолил, индолизинил, индазолил, пуринил, пирролопиридинил, фуропиридинил, бензофуранил, изобензофуранил, бензотиенил, бензоимидазолил, бензоксазолил, бензоизоксазолил, бензотиазолил, бензоизотиазолил, бензоксадиазолил, бензотиадиазолил и другие.

10 В отношении их предполагаемого использования, переменные  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $Y$ ,  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ , а и b в формуле I, в частности, имеют следующие значения, где они представляют собой, рассматриваемые как сами по себе, так и в комбинации с по меньшей мере одним другим или всеми, специальными вариантами осуществления соединений формулы I:

15  $R^1$  предпочтительно представляет собой водород или группу  $-CH_2R^{1a}$ , где  $R^{1a}$  выбирают из группы, включающей водород, метил, фенил и 5-ти - 10-ти членное гетероароматическое кольцо, содержащее от 1 до 4 гетероатомов или гетеро-групп, независимо выбранных из группы, включающей N,  $NR^c$ , O и S в качестве кольцевого (ых) члена (ов), где 5-ти - 10-ти членное гетероароматическое кольцо не замещено или может нести 1, 2 или 3 радикала  $R^7$ , где  $R^c$  и  $R^7$  имеют одно из вышеуказанных общих значений или, в особенности, имеют одно из указанных ниже предпочтительных значений.

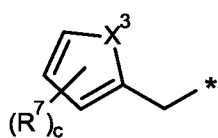
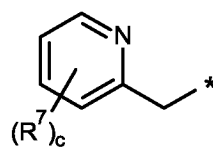
20 Более предпочтительно,  $R^1$  выбирают из группы, включающей водород и группу  $-CH_2R^{1a}$ , где  $R^{1a}$  выбирают из группы, включающей водород, метил и 5-ти - 6-ти членное моноциклическое гетероароматическое кольцо, содержащее от 1 до 3 гетероатомов, в особенности 1 гетероатом, независимо выбранный из группы, включающей N, O и S, в качестве кольцевого (ых) члена (ов), где 5-ти - 6-ти членное моноциклическое гетероароматическое кольцо не замещено или несет 1 радикал  $R^7$ , где  $R^7$  выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси.

30 В особенности,  $R^1$  выбирают из группы, включающей водород и группу  $-CH_2R^{1a}$ , где  $R^{1a}$  выбирают из группы, включающей водород и незамещенное 5-ти - 6-ти членное моноциклическое гетероароматическое кольцо, содержащее от 1

до 3 гетероатомов, в особенности 1 гетероатом, независимо выбранный из группы, включающей N, O и S, в качестве кольцевого (ых) члена (ов).

Особенно предпочтительно,  $R^1$  представляет собой группу  $-CH_2R^{1a}$ , где  $R^{1a}$  представляет собой незамещенное 5-ти - 6-ти членное моноциклическое гетероароматическое кольцо, содержащее от 1 до 3 гетероатомов, независимо выбранных из группы, включающей N, O и S, в качестве кольцевого (ых) члена (ов). Специфически,  $R^1$  представляет собой группу  $-CH_2R^{1a}$ , где  $R^{1a}$  представляет собой незамещенное 5-ти - 6-ти членное моноциклическое гетероароматическое кольцо, содержащее 1 гетероатом, выбранный из группы, включающей N, O и S в качестве кольцевого члена. Чрезвычайно специфически,  $R^1$  представляет собой группу  $-CH_2R^{1a}$ , где  $R^{1a}$  представляет собой фурил, тиенил или пиридил.

В альтернативном более предпочтительном варианте осуществления,  $R^1$  выбирают из водорода, метила и группы  $CH_2-I'$  или  $CH_2-II'$

(CH<sub>2</sub>-I')(CH<sub>2</sub>-II')

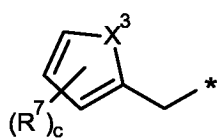
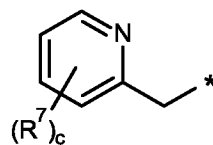
где \* указывает точку присоединения к атому азота мочевины и где

$X^3$  представляет собой  $NR^c$ , O или S;

c представляет собой 0, 1, 2 или 3; и

$R^7$  имеет значение, как определено в настоящей заявке.

В особенности,  $R^1$  выбирают из группы, включающей  $CH_2-I'$  и  $CH_2-II'$

(CH<sub>2</sub>-I')(CH<sub>2</sub>-II')

где \* указывает точку присоединения к атому азота мочевины и где  $R^7$ ,  $X^3$  и c имеют значения, как определено в настоящей заявке.

$R^2$  предпочтительно представляет собой водород или метил. В особенности  $R^2$  представляет собой водород.

$R^3$  предпочтительно представляет собой водород или метил. В особенности  $R^3$  представляет собой водород.

$R^4$  предпочтительно представляет собой метил или этил. В особенности  $R^4$  представляет собой метил.

Предпочтительно, каждый  $R^5$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил,  $C_1$ - $C_2$ -галоалкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси фтор. Более предпочтительно, каждый  $R^5$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси. Еще более предпочтительно, каждый  $R^5$  независимо выбирают из группы, включающей фтор, метил и трифторметил. В особенности, каждый  $R^5$  независимо выбирают из группы, включающей фтор и метил.

Предпочтительно, каждый  $R^6$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил,  $C_1$ - $C_2$ -галоалкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси фтор. Более предпочтительно, каждый  $R^6$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси. Еще более предпочтительно, каждый  $R^6$  независимо выбирают из фтора, метила и трифторметила. В особенности, каждый  $R^6$  независимо выбирают из фтора или метила.

$X^1$  представляет собой  $NR^a$  или O. Предпочтительно,  $X^1$  представляет собой NH или O.

Предпочтительно,  $X^2$  представляет собой O или S. В особенности,  $X^2$  представляет собой O.

В предпочтительном варианте осуществления, Y представляет собой атом кислорода. В другом предпочтительном варианте осуществления, Y представляет собой два атома водорода.

Предпочтительно,  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$  каждый независимо выбирают из группы, включающей водород и  $C_1$ - $C_3$ -алкил. Более предпочтительно,  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$  каждый независимо выбирают из водорода и метила. В особенности,  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$  представляют собой водород.

Предпочтительно, a представляет собой 0, 1, 2 или 3. Более предпочтительно, a представляет собой 0, 1 или 2. В особенности a представляет собой 0.

Предпочтительно, b представляет собой 0, 1 или 2. Более предпочтительно, b представляет собой 0 или 1. В особенности b представляет собой 0.

В группе формулы  $CH_2-I'$  переменные  $X^3$ , c и  $R^7$ , если они присутствуют, рассматриваемые как сами по себе, так и в комбинации с по меньшей мере одним другим или всеми, в особенности имеют следующие значения:

Предпочтительно, каждый  $R^7$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил,  $C_1$ - $C_2$ -галоалкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси. Более предпочтительно, каждый  $R^7$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил и  $C_1$ - $C_2$ -галоалкил. Еще более предпочтительно, каждый  $R^7$  независимо выбирают из фтора, метила и трифторметила. В особенности, каждый  $R^7$  независимо выбирают из фтора и метила.

Предпочтительно,  $X^3$  представляет собой O или S. В особенности,  $X^3$  представляет собой O. В другом предпочтительном варианте осуществления,  $X^3$  представляет собой S.

Предпочтительно, с представляет собой 0, 1 или 2. Более предпочтительно, с представляет собой 0 или 1. В особенности с представляет собой 0.

В группе формулы  $CH_2-II'$  переменные с и  $R^7$ , если они присутствуют, рассматриваемые как сами по себе, так и в комбинации с по меньшей мере одним другим или всеми, в особенности имеют следующие значения:

Предпочтительно, каждый  $R^7$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил,  $C_1$ - $C_2$ -галоалкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси. Более предпочтительно, каждый  $R^7$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил и  $C_1$ - $C_2$ -галоалкил. Еще более предпочтительно, каждый  $R^7$  независимо выбирают из фтора, метила и трифторметила. В особенности, каждый  $R^7$  независимо выбирают из фтора и метила.

Предпочтительно, с представляет собой 0, 1 или 2. Более предпочтительно, с представляет собой 0 или 1. В особенности с представляет собой 0.

Предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к соединениям общей формулы I, где,

$R^1$  представляет собой водород или группу  $-CH_2R^{1a}$ , где  $R^{1a}$  представляет собой водород или незамещенное 5-ти - 6-ти членное моноциклическое гетероароматическое кольцо, содержащее от 1 до 3 гетероатомов, в особенности 1 гетероатом, независимо выбранный из группы, включающей N, O и S, в качестве кольцевого (ых) члена (ов);

$R^2$  водород или метил;

$R^3$  представляет собой водород или метил;

$R^4$  представляет собой  $C_1$ - $C_2$ -алкил;

каждый  $R^5$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил,  $C_1$ - $C_2$ -галоалкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси;

каждый  $R^6$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил,  $C_1$ - $C_2$ -галоалкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси;

каждый  $R^7$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил,  $C_1$ - $C_2$ -галоалкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси;

5  $X^1$  представляет собой  $NR^a$  или O;

$X^2$  представляет собой O или S;

Y представляет собой атом кислорода или два атома водорода;

$R^a$  выбирают из группы, включающей водород и  $C_1$ - $C_3$ -алкил;

a представляет собой 0, 1, 2 или 3; и

10 b представляет собой 0, 1 или 2;

и его фармацевтически приемлемые соли.

Более предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к соединениям общей формулы I, где,

15  $R^1$  представляет собой водород или группу  $-CH_2R^{1a}$ , где  $R^{1a}$  представляет собой водород или незамещенное 5-ти - 6-ти членное моноциклическое гетероароматическое кольцо, содержащее 1 гетероатом, выбранный из группы, включающей N, O и S в качестве кольцевого члена;

$R^2$  представляет собой водород или метил;

$R^3$  представляет собой водород;

20  $R^4$  представляет собой метил;

$X^1$  представляет собой NH или O;

$X^2$  представляет собой O;

Y представляет собой атом кислорода или два атома водорода;

a представляет собой 0; и

25 b представляет собой 0;

и его фармацевтически приемлемые соли.

Предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к соединениям общей формулы I, где,

30  $R^1$  представляет собой группу  $-CH_2R^{1a}$ , где  $R^{1a}$  представляет собой незамещенное 5-ти - 6-ти членное моноциклическое гетероароматическое кольцо, содержащее 1 гетероатом, выбранный из группы, включающей N, O и S в качестве кольцевого члена;

$R^2$  представляет собой водород;

$R^3$  представляет собой водород;

$R^4$  представляет собой метил;  
 $X^1$  представляет собой NH или O;  
 $X^2$  представляет собой O;  
Y представляет собой атом кислорода или два атома водорода;  
5 a представляет собой 0; и  
b представляет собой 0;  
и его фармацевтически приемлемые соли.

Другой предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к соединениям общей формулы I, где,

10  $R^1$  представляет собой водород, метил или группу  $CH_2-I'$  или  $CH_2-II'$ ,  
 $R^2$  выбирают из водорода и метила;  
 $R^3$  выбирают из водорода и метила;  
 $R^4$  представляет собой  $C_1-C_2$ -алкил;  
каждый  $R^5$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1-C_3$ -алкил,  
15  $C_1-C_2$ -галоалкил и  $C_1-C_2$ -алкокси;  
каждый  $R^6$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1-C_3$ -алкил,  
 $C_1-C_2$ -галоалкил и  $C_1-C_2$ -алкокси;  
каждый  $R^7$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1-C_3$ -алкил,  
 $C_1-C_2$ -галоалкил и  $C_1-C_2$ -алкокси;  
20  $X^1$  представляет собой  $NR^a$  или O;  
 $X^2$  представляет собой O или S;  
 $X^3$  представляет собой O или S;  
Y представляет собой атом кислорода или два атома водорода;  
 $R^a$  выбирают из группы, включающей водород и  $C_1-C_3$ -алкил;  
25 a представляет собой 0, 1, 2 или 3;  
b представляет собой 0, 1 или 2; и  
c представляет собой 0, 1 или 2;  
и его фармацевтически приемлемые соли.

Другой более предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к соединениям общей формулы I, где,

30  $R^1$  представляет собой водород, метил или группу  $CH_2-I'$  или  $CH_2-II'$ ,  
 $R^2$  представляет собой водород или метил;  
 $R^3$  представляет собой водород;  
 $R^4$  представляет собой метил;



каждый  $R^5$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси;

каждый  $R^6$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси;

5 каждый  $R^7$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси;

$X^1$  представляет собой NH или O;

$X^2$  представляет собой O;

$X^3$  представляет собой O или S;

10 Y представляет собой атом кислорода или два атома водорода;

a представляет собой 0, 1 или 2;

b представляет собой 0 или 1; и

c представляет собой 0 или 1;

и его фармацевтически приемлемые соли.

15 Еще более предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к соединениям общей формулы I, где,

$R^1$  представляет собой водород, метил или группу  $CH_2-I'$  или  $CH_2-II'$ ,

$R^2$  представляет собой водород или метил;

$R^3$  представляет собой водород;

20  $R^4$  представляет собой метил;

каждый  $R^5$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси;

каждый  $R^6$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси;

25 каждый  $R^7$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси;

$X^1$  представляет собой NH или O;

$X^2$  представляет собой O;

$X^3$  представляет собой O или S;

30 Y представляет собой атом кислорода или два атома водорода;

a представляет собой 0;

b представляет собой 0; и

c представляет собой 0;

и его фармацевтически приемлемые соли.

Другой предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к соединениям общей формулы I, где,

$R^1$  представляет собой группу  $CH_2-I'$  или  $CH_2-II'$ ,

$R^2$  представляет собой водород;

5  $R^3$  представляет собой водород;

$R^4$  представляет собой метил;

$X^1$  представляет собой NH или O;

$X^2$  представляет собой O;

$X^3$  представляет собой O или S;

10 Y представляет собой атом кислорода или два атома водорода;

a представляет собой 0;

b представляет собой 0; и

c представляет собой 0;

и его фармацевтически приемлемые соли.

15 Другая предпочтительная группа вариантов осуществления относится к соединениям общей формулы I, где группа  $CH_2-I'$ ,

$X^3$  представляет собой O или S;

каждый  $R^7$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1-C_3$ -алкил,  $C_1-C_2$ -галоалкил и  $C_1-C_2$ -алкокси; и

20 c представляет собой 0, 1 или 2.

Другая предпочтительная группа вариантов осуществления относится к соединениям общей формулы I, где группа  $CH_2-II'$ ,

каждый  $R^7$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1-C_3$ -алкил,  $C_1-C_2$ -галоалкил и  $C_1-C_2$ -алкокси; и

25 c представляет собой 0, 1 или 2.

Еще более предпочтительная группа вариантов осуществления относится к соединениям общей формулы I, где группа  $CH_2-I'$ ,

$X^3$  представляет собой O или S;

каждый  $R^7$  независимо выбирают из фтора, метила или трифторметила; и

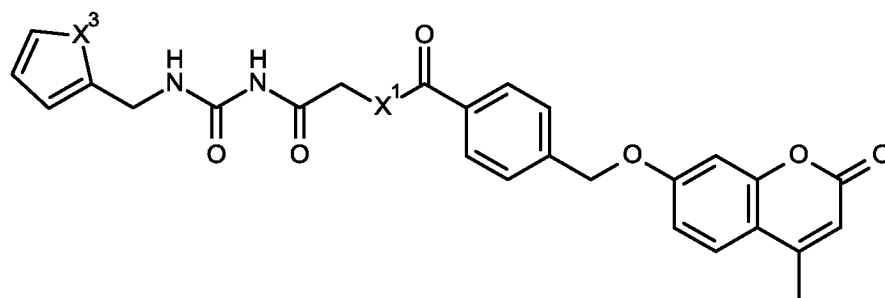
30 c представляет собой 0 или 1.

Еще более предпочтительная группа вариантов осуществления относится к соединениям общей формулы I, где группа  $CH_2-II'$ ,

каждый  $R^7$  независимо выбирают из фтора, метила или трифторметила; и

c представляет собой 0 или 1.

Особенно предпочтительный вариант осуществления согласно изобретению относится к соединению формулы I, которое соответствует формуле I-A,



(I-A)

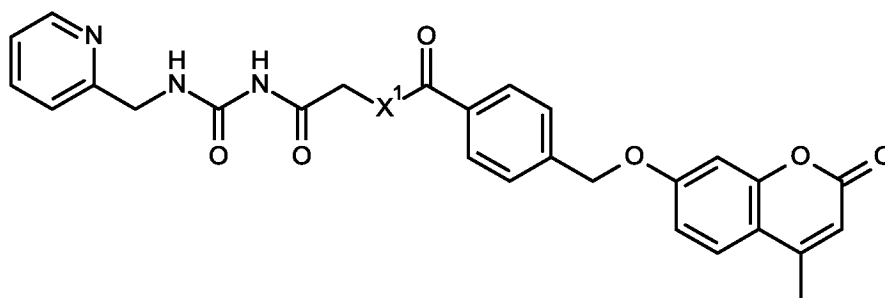
5 где

$X^1$  представляет собой NH или O; и

$X^3$  представляет собой O или S;

и его фармацевтически приемлемые соли.

10 Другой особенно предпочтительный вариант осуществления согласно изобретению относится к соединению формулы I, которое соответствует формуле I-B,



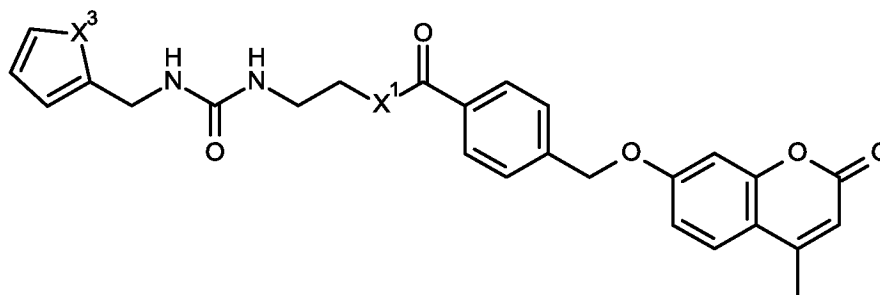
(I-B)

где

15  $X^1$  представляет собой NH или O;

и его фармацевтически приемлемые соли,

Другой особенно предпочтительный вариант осуществления согласно изобретению относится к соединению формулы I, которое соответствует формуле I-C,



(I-C)

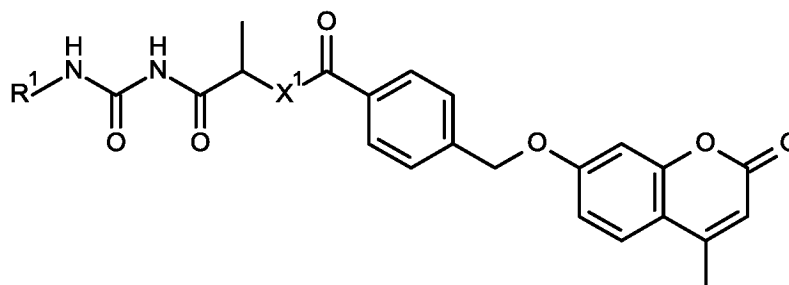
где

$X^1$  представляет собой NH или O; и

5  $X^3$  представляет собой O или S;

и его фармацевтически приемлемые соли.

Другой особенно предпочтительный вариант осуществления согласно изобретению относится к соединениям формулы I, которые соответствуют формуле I-D,



(I-D)

где

$R^1$  выбирают из водорода или метила; и

$X^1$  представляет собой NH или O;

15 и его фармацевтически приемлемые соли.

Особенно предпочтительное соединение формулы I представляет собой [2-(2-фурилметилкарбамоил-амино)-2-оксо-этил] 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензоат (то есть соединение I, где  $R^1$  представляет собой группу - $CH_2R^{1a}$ , где  $R^{1a}$  представляет собой фуран-2-ил,  $R^2$  представляет собой H,  $R^3$  представляет собой H,  $R^4$  представляет собой метил,  $X^1$  представляет собой O,  $X^2$  представляет собой O, Y представляет собой O, a представляет собой 0 и b представляет собой 0) и его фармацевтически приемлемые соли. Это соединение также обозначается термином MyoMed-946 в дальнейшем.

Другое особенно предпочтительное соединение формулы I представляет собой N-[2-(2-фурилметилкарбамоиламино)-2-оксо-этил]-4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензамид (то есть соединение I, где R<sup>1</sup> представляет собой группу -CH<sub>2</sub>R<sup>1a</sup>, где R<sup>1a</sup> представляет собой фуран-2-ил, R<sup>2</sup> представляет собой H, R<sup>3</sup> представляет собой H, R<sup>4</sup> представляет собой метил, X<sup>1</sup> представляет собой NH, X<sup>2</sup> представляет собой O, Y представляет собой O, а представляет собой 0 и b представляет собой 0) и его фармацевтически приемлемые соли.

Другое особенно предпочтительное соединение формулы I представляет собой [2-оксо-2-(2-тиенилметилкарбамоиламино)этил] 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]-бензоат (то есть соединение I, где R<sup>1</sup> представляет собой группу -CH<sub>2</sub>R<sup>1a</sup>, где R<sup>1a</sup> представляет собой тиен-2-ил, R<sup>2</sup> представляет собой H, R<sup>3</sup> представляет собой H, R<sup>4</sup> представляет собой метил, X<sup>1</sup> представляет собой O, X<sup>2</sup> представляет собой O, Y представляет собой O, а представляет собой 0 и b представляет собой 0) и его фармацевтически приемлемые соли.

Другое особенно предпочтительное соединение формулы I представляет собой 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]-N-[2-оксо-2-(2-тиенилметилкарбамоиламино)этил]-бензамид (то есть соединение I, где R<sup>1</sup> представляет собой группу -CH<sub>2</sub>R<sup>1a</sup>, где R<sup>1a</sup> представляет собой тиен-2-ил, R<sup>2</sup> представляет собой H, R<sup>3</sup> представляет собой H, R<sup>4</sup> представляет собой метил, X<sup>1</sup> представляет собой NH, X<sup>2</sup> представляет собой O, Y представляет собой O, а представляет собой 0 и b представляет собой 0) и его фармацевтически приемлемые соли.

Другое особенно предпочтительное соединение формулы I представляет собой [2-оксо-2-(2-пиридилметилкарбамоиламино)этил] 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)окси-метил]бензоат (то есть соединение I, где R<sup>1</sup> представляет собой группу -CH<sub>2</sub>R<sup>1a</sup>, где R<sup>1a</sup> представляет собой пиридин-2-ил, R<sup>2</sup> представляет собой H, R<sup>3</sup> представляет собой H, R<sup>4</sup> представляет собой метил, X<sup>1</sup> представляет собой O, X<sup>2</sup> представляет собой O, Y представляет собой O, а представляет собой 0 и b представляет собой 0) и его фармацевтически приемлемые соли. Это соединение также обозначается термином MyoMed-203 в дальнейшем.

Другое особенно предпочтительное соединение формулы I представляет собой

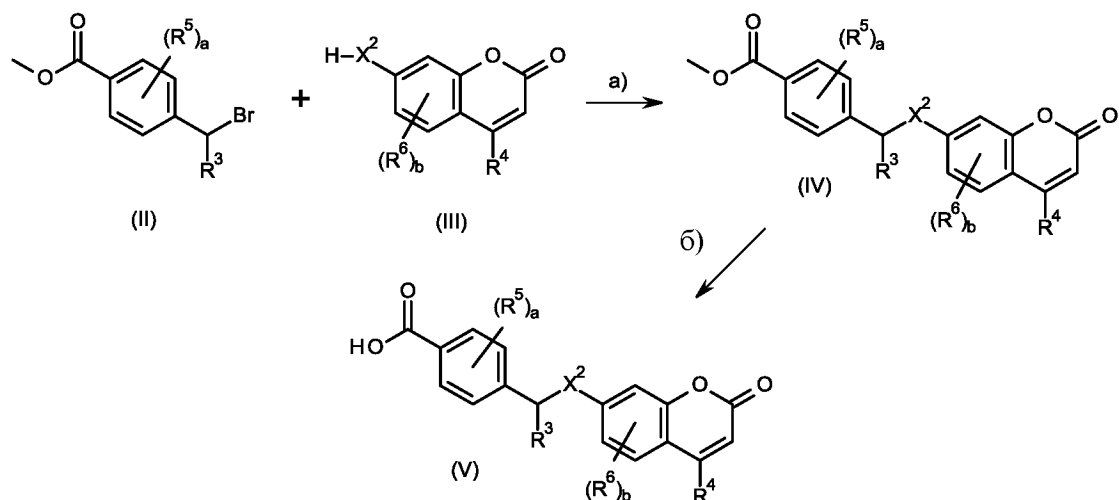
4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]-N-[2-(2-тиенилметилкарбамоиламино)этил]бензамид (то есть соединение I, где R<sup>1</sup> представляет собой группу -CH<sub>2</sub>R<sup>1a</sup>, где R<sup>1a</sup> представляет собой тиен-2-ил, R<sup>2</sup> представляет собой H, R<sup>3</sup> представляет собой H, R<sup>4</sup> представляет собой метил, X<sup>1</sup> представляет собой NH, X<sup>2</sup> представляет собой O, Y представляет собой два атома водорода (то есть C=Y представляет собой CH<sub>2</sub>), а представляет собой 0 и b представляет собой 0) и его фармацевтически приемлемые соли. Это соединение также обозначается термином MyoMed-205 в дальнейшем.

10 Другое особенно предпочтительное соединение формулы I представляет собой (1-метил-2-оксо-2-уреидо-этил) 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензоат (то есть соединение I, где R<sup>1</sup> представляет собой H, R<sup>2</sup> представляет собой метил, R<sup>3</sup> представляет собой H, R<sup>4</sup> представляет собой метил, X<sup>1</sup> представляет собой O, X<sup>2</sup> представляет собой O, Y представляет собой O, а представляет собой 0 и b представляет собой 0) и его фармацевтически приемлемые соли. Это соединение также обозначается термином MyoMed-946-5 в дальнейшем.

20 Другое особенно предпочтительное соединение формулы I представляет собой [1-метил-2-(метилкарбамоил-амино)-2-оксо-этил] 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]-бензоат (то есть соединение I, где R<sup>1</sup> представляет собой группу -CH<sub>2</sub>R<sup>1a</sup>, где R<sup>1a</sup> представляет собой H, R<sup>2</sup> представляет собой метил, R<sup>3</sup> представляет собой H, R<sup>4</sup> представляет собой метил, X<sup>1</sup> представляет собой O, X<sup>2</sup> представляет собой O, Y представляет собой O, а представляет собой 0 и b представляет собой 0) и его фармацевтически приемлемые соли. Это соединение также обозначается термином MyoMed-946-8 в дальнейшем.

30 Соединения I в соответствии с изобретением могут быть приготовлены аналогично способам, известным из литературы. Важный подход для получения соединений в соответствии с изобретением предлагается путем реакции 4-бромалкил-замещенного метилбензоатного соединения II с хромен-2-он соединением III до 2-оксохромен-замещенного метилбензоатного соединения IV, которое гидролизуют до промежуточного соединения бензойной кислоты V, как представлено на схеме 1.

Схема 1:



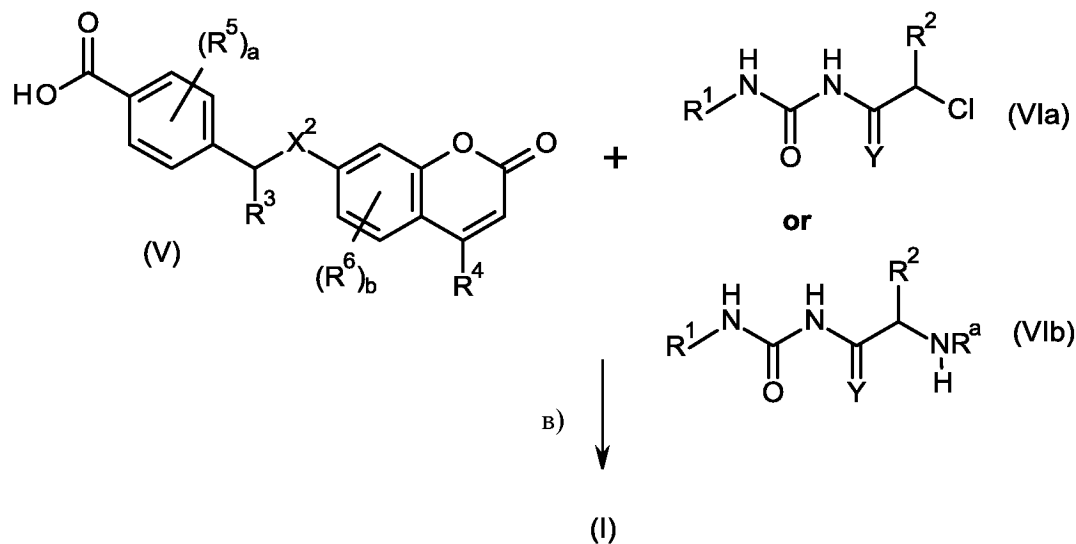
На схеме 1 переменные R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, X<sup>2</sup>, а и b имеют вышеуказанные значения.

- 5 На стадии а) схемы 1, бромид формулы (II) подвергают реакции с OH, SH или HNR<sup>b</sup> группой (H-X<sup>2</sup>-группой) соединения III, в условиях, подходящих для реакций нуклеофильного замещения. Квалифицированный специалист в данной области знаком с условиями реакций, которые необходимы для этого типа
- 10 реакций нуклеофильного замещения. Типично, эту реакцию осуществляют в присутствии основания. Подходящие основания могут быть неорганическими или органическими. Примерами для подходящих неорганических оснований являются карбонаты щелочных металлов, например, Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> или Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, гидроксиды щелочных металлов, например, LiOH, NaOH или KOH, или фосфаты, например, Li<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> или Cs<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Примерами для
- 15 подходящих органических оснований являются, например, третичные амины, например, триметиламин, триэтиламин, трипропиламин, этилдиизопропиламин (DIPEA) и другие, щелочные N-гетероциклы, такие как морфолин, пиридин, лутидин, DABCO, DBU или DBN, или алкоксилаты, такие как натрий или калий метанолат, этанолат, пропанолат, изопропанолат, бутанолат или *трет-*
- 20 бутанолат.

Таким образом полученный сложный метиловый эфир соединения формулы (IV) омыляют на стадии б) схемы 1 в присутствии сильного основания, такого как гидроксиды щелочных металлов, например, LiOH, NaOH или KOH, получая соединение бензойной кислоты формулы (V).

После этого промежуточное соединение бензойной кислоты V подвергают дальнейшей реакции с соединением мочевины VIa или VIb, получая соединения I в соответствии с настоящим изобретением, как представлено на схеме 2.

Схема 2:



5

На схеме 2, переменные R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, X<sup>2</sup>, Y, R<sup>a</sup>, a и b имеют вышеуказанные значения.

На стадии в) схемы 2, промежуточное соединение бензойной кислоты формулы (V) подвергают реакции либо с соединением мочевины формулы (VIa),  
 10 содержащим хлоридную группу, или с соединением мочевины формулы (VIb), содержащим N(H)R<sup>a</sup> группу, с образованием соответствующих сложноэфирных или амидных соединений формулы I. Реакцию промежуточного соединения бензойной кислоты формулы (V) с соединением мочевины формулы (VIa), содержащим хлоридную группу на стадии в) схемы 2, осуществляют в условиях,  
 15 подходящих для реакций нуклеофильного замещения. Квалифицированный специалист в данной области знаком с условиями реакций, необходимых для реакций этих типов. Типично, эту реакцию осуществляют в присутствии основания, как определено выше, для нейтрализации кислоты, образованной во время реакции. При необходимости, соединения (VIa) могут быть  
 20 дополнительно активированы *in situ* путем добавления подходящих бромид- или, в особенности, йодидных солей, к реакции нуклеофильного замещения. Подходящие бромид- или йодидные соли представляют собой, например, бромиды или йодиды щелочных металлов и бромиды или йодиды



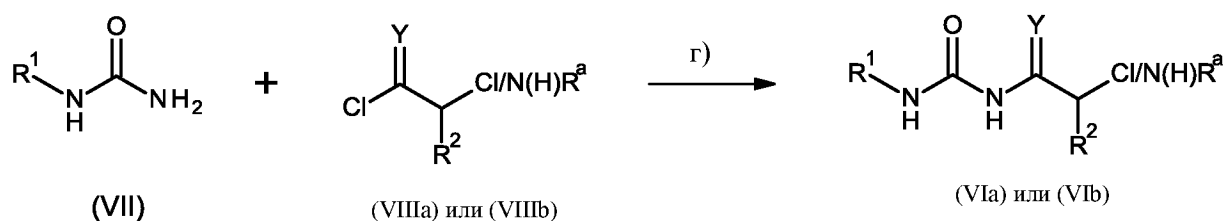
тетраалкиламмония. Примеры включают бромид натрия, йодид натрия, бромид калия, йодид калия, бромид тетрабутиламмония и йодид тетрабутиламмония.

Реакцию промежуточного соединения бензойной кислоты формулы (V) с соединением мочевины формулы (VIb), содержащим  $N(H)R^a$  группу на стадии в) 5  
схемы 2, осуществляют в условиях, подходящих для образования амидной связи. Квалифицированный специалист в данной области знаком с условиями реакций, которые необходимы для этого типа реакции. Типично, образование амидной связи осуществляют в присутствии связующего реагента. Подходящие связующие реагенты (активаторы) хорошо известны и выбирают, например, из 10  
группы, включающей карбодиимиды, такие как EDCI (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид; также сокращенно обозначаемый как EDC), DCC (дициклогексилкарбодиимид) и DIC (диизопропилкарбодиимид), производные бензотриазола, такие как HOAt (1-гидрокси-7-азабензотриазол, HOBT (1-гидроксибензотриазол), HATU (гексафторфосфат O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония), HBTU (гексафторфосфат (O-бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония) и HCTU (1H-бензотриазолий-1-[бис(диметиламино)метиле]-5-хлор тетрафторборат), активаторы-производные фосфония, такие как BOP (гексафторфосфат (бензотриазол-1-илокси)-трис(диметиламино)фосфония), Py-BOP (гексафторфосфат (бензотриазол-1-илокси)-трипирролидинфосфония) и Py-BrOP (гексафторфосфат бромтрипирролидинфосфония), и другие, такие как COMU ((1-циано-2-этокси-2-оксоэтилиденаминоокси)диметиламино-морфолино-карбенил-гексафторфосфат). 15  
Вышеописанные активаторы также можно использовать в комбинации друг с другом. Как правило, активатор используют в по меньшей мере эквивалентных количествах, по отношению к этому реагенту, не используемому в избытке. Бензотриазольный и фосфониевый связующие реагенты обычно используют в щелочной среде. Альтернативно, промежуточное соединение карбоновой кислоты формулы (V) сначала может быть превращено в так называемый активный сложный эфир, который получают в формальном смысле путем 20  
реакции карбоновой кислоты со спиртом, образующим активный сложный эфир, таким как *m*-нитрофенол, N-гидроксибензотриазол (HOBT), N-гидрокси-сукцинимид или OPfp (пентафторфенол). Затем активный сложный эфир подвергают реакции с амином **3** либо в присутствии или отсутствии связующего реагента. 30

Соединения формулы (II) и (III) можно либо купить или можно синтезировать, используя процессы, хорошо известные квалифицированному специалисту в данной области техники.

Соединения формулы (VIa) и (VIb) можно либо купить или синтезировать, например, согласно процедуре, как представлено на схеме 3.

Схема 3:



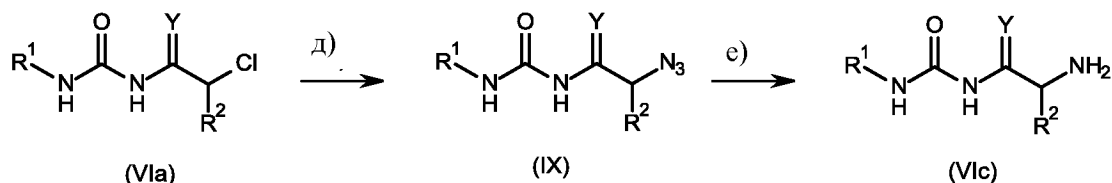
На схеме 3 переменные  $R^1$ ,  $R^2$  и  $R^a$  имеют вышеуказанные значения. На стадии г) схемы 3, в случае, где Y представляет собой атом кислорода, соединение мочевины (VII) подвергают реакции с хлорангидридом (VIIIa) или (VIIIb), в условиях нуклеофильного ацилирования. Условия реакций, подходящие для реакций ацилирования, хорошо известны квалифицированному специалисту в данной области техники. В том случае, где Y представляет собой два атома водорода, осуществляют в условиях, подходящих для реакций нуклеофильного замещения. Квалифицированный специалист в данной области знаком с условиями реакций, необходимых для реакций этих типов. При необходимости, соединения (VIIIa) могут быть дополнительно активированы *in situ*, как описано выше. Типично, стадию г) осуществляют в присутствии основания, такого как третичные амины, как определено выше, для закаливания гидрохлорида или других кислот, которые образуются во время реакции.

В некоторых предпочтительных случаях может являться необходимым использовать подходящие защитные группы для избегания побочных реакций с другими реакционно-способными группами, которые могут присутствовать в соединениях (VII), (VIIIa) или (VIIIb) и могут вступать в или разрушаться в реакции. В этих случаях, могут быть необходимы дополнительные стадии снятия защиты для удаления этих защитных групп после образования амидной связи. Подходящие защитные группы и способы для защиты и снятия защиты различных заместителей, используя такие подходящие защитные группы, хорошо известны квалифицированным специалистам в данной области техники;

примеры их можно найти в T. Greene и P. Wuts, *Protective Groups in Organic Синтез* (3-ье изд.), John Wiley & Sons, NY (1999).

Кроме того, соединения (VIc) могут быть приготовлены из соединений (VIa), например, с помощью процедуры, как представлено на схеме 4.

5       Схема 4:



На схеме 4 переменные  $R^1$ ,  $R^2$  и  $Y$  имеют вышеуказанные значения. На стадии д) схемы 4 соединение мочевины (VIa) переносят на азидное соединение (IX) в присутствии источника азидов, такого как фосфорил азид, азотистоводородная кислота или азид натрия, азид, или с помощью реакции Штаудингера с  $PPh_3$  или другими реагентами фосфора, как описано Zwierzak, A. в *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* (1993), 75:1-4, 51-54. Типично, стадию д) осуществляют в присутствии основания, такого как третичные амины, как определено выше, для закаливания гидрохлорида, который образуется во время реакции.

10  
15

На стадии е) схемы 4, азидную группу соединений (IX) восстанавливают с помощью водорода в присутствии катализатора гидрирования или подвергают реакции с гидридом, получая аминовые соединения (VIc). Условия реакций, подходящие для реакций этого типа, хорошо известны квалифицированному специалисту в данной области техники.

20

Если специально не указано иначе, то вышеописанные реакции типично осуществляют в органическом растворителе, включая апротонный органический растворитель, например, замещенные амиды, лактамы и мочевины; такие как диметилформамид, диметилацетамид, N-метилпирролидон, тетраметилмочевина, циклические простые эфиры; такие как диоксан, тетрагидрофуран, галогенированные углеводороды; такие как дихлорметан, и их смеси, а также их смеси с  $C_1$ - $C_6$ -алканами и/или водой.

25

Реакции, описанные выше, обычно осуществляют при температурах в интервале от комнатной температуры до температуры кипения применяемого растворителя, в зависимости от реакционной способности используемых соединений.

30

Реакционные смеси обрабатывают общепринятым образом, например, путем смешивания с водой, разделения фаз и, если это является подходящим, очистка неочищенных продуктов путем хроматографии. Если промежуточные соединения и конечные продукты получают в виде твердых веществ, то очистку также можно осуществлять путем перекристаллизации или расщепления.

Общепринятые эксперименты, включая соответствующие манипуляции с условиями реакций, реагентами и последовательностью путей синтеза, защита любой функциональной группы, которая может быть несовместимой с условиями реакций, и снятие защиты в подходящей точке в последовательности реакций способов получения находятся в пределах общепринятых методик.

Как уже было указано выше, было обнаружено, что соединения общей формулы I способны смягчать истощение мышечной ткани и сократительные дисфункции на тестируемых клетках, а также в клинически релевантных животных моделях.

Следовательно, изобретение относится к соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики состояний истощения мышечной ткани.

Термины "лечение" и "лечить", как используется в настоящей заявке в связи с состояниями истощения мышечной ткани и миопатии, относится к лечению симптомов, то есть истощения мышечной ткани или ослабления мышц, связанных с состоянием и/или заболеванием.

Термин "профилактика", как используется в настоящей заявке в связи с состояниями истощения мышечной ткани и миопатии, относится к профилактическому лечению, то есть лечению для предотвращения или уменьшения риска истощения мышечной ткани или ослабления мышц, связанных с состоянием и/или заболеванием.

Термин "истощение мышечной ткани", как используется в настоящей заявке, следует понимать как относящийся к уменьшению размера (уменьшение площади поперечного сечения) и количества мышечных волокон, наблюдаемое как снижение массы мышцы, что также обозначается как мышечная атрофия в научной и медицинской литературе.

Термин "миопатия", как используется в настоящей заявке, относится к заболеванию мышц, при котором мышечные волокна не функционируют надлежащим образом. Это приводит к мышечной слабости. Термин "миопатия",

как используется в настоящей заявке, относится, в особенности, к миопатиям, которые связаны с увеличенной экспрессией Muscle RING Finger 1 (MuRF1). Однако предполагается, что действие соединений согласно настоящему изобретению не ограничивается этим путем.

5 Предполагают, что истощение мышечной ткани вызывается изменением баланса между синтезом мышечного белка и разложением мышечного белка. В особенности, полагают, что при атрофии активированы пути разложения мышечного белка, такие как убиквитинирование мышечных белков.

10 Истошение мышечной ткани типично наблюдается у пациентов, страдающих от кахексии, например, кахексии, вызванной сердечными заболеваниями, то есть сердечной кахексии. Кроме того, истощение мышечной ткани в особенности поражает скелетные мышцы, что приводит к деградации скелетных мышц, то есть атрофии скелетных мышц. Однако истощение мышечной ткани также может поражать сердечные мышцы.

15 Таким образом, предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики сердечной кахексии, атрофии скелетных мышц или атрофии сердечных мышц.

20 Сердечную кахексию, атрофию сердечных и скелетных мышц, наблюдают, например, у пациентов, страдающих от инфаркта миокарда, что типично приводит к ухудшению их симптомов и прогноза и что может существенно пролонгировать их выздоровление.

25 Следовательно, предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики сердечной кахексии, атрофии скелетных мышц или атрофии сердечных мышц, где сердечная кахексия и атрофия сердечных или скелетных мышц вызываются инфарктом миокарда.

30 Существует огромное количество заболеваний, связанных с известными состояниями, но также и различные физические состояния, которые не связаны с заболеванием, что вызывает атрофию сердечных или скелетных мышц и/или кахексию.

Состояния, связанные с заболеванием, что может вызывать атрофию сердечных или скелетных мышц и/или кахексию, представляют собой, например, застойную сердечную недостаточность, хроническую сердечную

недостаточность, инфаркт миокарда, злокачественное новообразование, врождённую миопатию, СПИД, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), рассеянный склероз, семейную амилоидную полинейропатию, снижение кровоснабжения, гормональную недостаточность, хроническое заболевание почек, почечную недостаточность, диабет, инфекционное заболевание, хронический панкреатит и аутоиммунные нарушения.

Физические состояния, которые могут вызывать атрофию скелетных мышц и/или кахексию, и которые не связаны с заболеванием, представляют собой, например, тяжелые ожоги, денервацию, временную или длительную иммобилизацию, длительную искусственную вентиляцию легких, саркопению при старении, продолжительное состояние невесомости, недостаточность питания и чрезмерное употребление лекарственных средств.

Определенные химиотерапевтические агенты, используемые для лечения злокачественного новообразования, проявляют кардио- и миотоксичность. Например, применение доксорубина, который является эффективным химиотерапевтическим лекарственным средством, используемым для лечения различных злокачественных новообразований, связан с ранней и хронической кардиотоксичностью и миотоксичностью (К.М. Cho и др., *Oncotarget*, 2017, 8(45), 79441–79452; D.S. Hydock и др., *Characterization of the Effect of In Vivo Doxorubicin Treatment on Skeletal Muscle Function in the Rat*, *International Journal of Cancer Research and Treatment*, 2011, 2028, 2023–2028; Т.А. Nissinen и др., *Sci. Rep.*, 2016, 6, 32695; M.S. Willis et al., *Circulation: Heart Failure*, 2019, 12(3), 1–12). У грызунов, однократная инъекция доксорубина способна уменьшать массу сердечных и скелетных мышц, с последующей заметной нарушением функции.

Предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей в результате одного из следующих заболеваний или состояний: застойная сердечная недостаточность, хроническая сердечная недостаточность, злокачественное новообразование, лечение злокачественного новообразования с применением миотоксических веществ, врождённая миопатия, СПИД, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), хроническое заболевание почек, почечная недостаточность, диабет, тяжелые

ожоги, саркопения при старении, снижение кровоснабжения, временная или длительная иммобилизация, длительная искусственная вентиляция легких, денервация, продолжительное состояние невесомости и недостаточность питания.

5 Настоящее изобретение также относится к лечению или профилактике диабета, в особенности диабета II типа. Не желая ограничиваться теорией, полагают, что положительное влияние на диабет основано на ингибировании MuRF1, что усиливает чувствительность мышц к инсулину. S. Hirner и др. продемонстрировали в *J. Mol. Biol.*, 2008, 379, 666–677, что MuRF1 и инсулин  
10 могут рассматриваться как функционально связаны антагонистическим образом в том понимании, что MuRF1 истощает запасы гликогена и ингибирует гликолиз, в то время как инсулин активирует гликолиз и увеличивает запасы гликогена. Следовательно, ингибирование MuRF1 может приводить к снижению потребности в инсулине и являться стратегией для лечения диабета.

15 Настоящее изобретение в особенности относится к:

- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей вследствие застойной сердечной недостаточности.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для  
20 лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей вследствие хронической сердечной недостаточности.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей вследствие злокачественного новообразования.
- 25 - Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей вследствие лечения злокачественного новообразования с применением миотоксических и/или кардиотоксических веществ, таких как доксорубицин.
- 30 - Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей вследствие врождённой миопатии.

- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей вследствие СПИДа.
- 5 - Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей вследствие хронического обструктивного заболевания легких (ХОЗЛ).
- 10 - Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей вследствие хронического заболевания почек.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей вследствие почечной недостаточности.
- 15 - Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей вследствие диабета.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей вследствие тяжелых ожогов.
- 20 - Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей в результате саркопении при старении.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей в результате снижения кровоснабжения.
- 25 - Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей в результате временной или длительной иммобилизации.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей в результате длительной искусственной вентиляции легких.
- 30 - Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей в результате денервации.



- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей в результате продолжительного состояния невесомости.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для
- 5 лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей в результате недостаточности питания.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики диабета.

Настоящее изобретение в особенности дополнительно относится к:

- 10 - Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики сердечной кахексии.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики опухолевой кахексии.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для
- 15 лечения инфаркта миокарда.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения хронической сердечной недостаточности.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для восстановления от искусственной вентиляции легких.

20 Настоящее изобретение специфически относится к:

- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для
- лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей в результате или связанной с сердечной недостаточностью со
- сниженной фракцией выброса (HF-rEF).
- 25 - Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для
- лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей в результате или связанной с сердечной недостаточностью с
- сохранённой фракцией выброса (HF-pEF).
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для
- 30 лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей в результате или связанной с гипертонией.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для
- лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей в результате или связанной с опухолевой кахексией.

- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики мышечной атрофии и/или кардиотоксичности, индуцированной Доксорубицином.
- 5 - Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики саркопении и/или кардиомиопатии при старении.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики мышечной атрофии вследствие хронического заболевания почек.
- 10 - Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики слабости диафрагмы вследствие искусственной вентиляции легких или застойной сердечной недостаточности.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики врождённой миопатии, в особенности имеющей  
15 общее происхождение мышечной атрофии.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики мышечной атрофии, индуцированной диабетом.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики диабета, в особенности диабета II типа.
- 20 Благодаря их способности понижающе регулировать функцию MuRF1 путем ингибирования активности убиквитин E3 лигазы MuRF1, а также путем ингибирования связывания MuRF1 с целевыми мышечными белками, такими как титин, соединения формулы I и их фармацевтически приемлемые соли, также пригодны для применения для лечения или профилактики состояния, связанной  
25 с увеличенной экспрессией Muscle RING Finger 1 (MuRF1); и в особенности миопатий, которые связаны с дисбалансом синтеза мышечного белка и разложения мышечного белка, что приводит к истощению мышечной ткани и миопатии, типично связанных с увеличенной экспрессией Muscle RING Finger 1 (MuRF1).
- 30 Следовательно, изобретение также относится к соединениям формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики состояний, которые связаны с увеличенной экспрессией Muscle RING Finger 1 (MuRF1).

В особенности, изобретение также относится к соединениям формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики миопатии, которые связаны с увеличенной экспрессией Muscle RING Finger 1 (MuRF1).

5 Миопатии, которые связаны с повышенной экспрессией MuRF1 выбирают из, например, миопатии критических состояний, немалиновой миопатии, воспалительной миопатии, миопатии вследствие диабета, миопатии вследствие лёгочной гипертензии, миопатий, которые развиваются при хронической сердечной недостаточности, в особенности подтипов сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса (HFrEF) и сердечной недостаточности с  
10 сохранённой фракцией выброса (HFpEF), миопатии вследствие почечной недостаточности и миопатии вследствие опухолевой кахексии.

Связь между повышенной экспрессией MuRF1 и миопатией вследствие лёгочной гипертензии, описана, например, в de Man и др., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2011 May 15, 183(10), 1411-1418.

15 Связь между повышенной экспрессией MuRF1 и миопатией при хронической сердечной недостаточности и/или почечной недостаточности, промотируемой ангиотензином II, описана, например, в du Bois и др., *Circ. Res.*, 2015 Aug 14, 117(5), 424-436.

Аналогично этому, Bowen и др., *Eur. J. Heart. Fail.*, 2015 Mar, 17(3), 263-  
20 272, описали связь между повышением экспрессии MuRF1 и миопатией, развивающейся при диастолической сердечной недостаточности (HFpEF).

Повышенная регуляция MuRF1 описана у пациентов с хронической почечной недостаточностью, и это тесно коррелирует с мышечной атрофией (J. Anfort и др., *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2019, 10(2), 323-337; S.H. Lecker и др., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2011, 22(5), 821-824). Следовательно, соединения, которые понижающе регулируют MuRF1, предположительно защищают  
25 сердечные мышцы при хронической почечной недостаточности. Концепция повреждения почек и мышечной атрофии также была дополнительно валидирована на животной модели, используя острое повреждение почек, вызванное гентамицином (J. Anfort и др., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2016, 79, 505-  
30 516).

MuRF1 повышенно регулируется при старении в скелетных мышцах (O. Rom и др., *Free Radic. Biol. Med.* 2016, 98, 218-230). Это связано с митохондриальной дисфункцией, что предположительно способствует

саркопении (потере миофибрилл) и кардиомиопатии (H.W. Liu и др., *Biogerontology*. 2020, 21(3), 367-380). Спасение от митохондриальной дисфункции спасает на мышинной модели от кардиомиопатии (Y.A. Chiao и др., *eLife*, 2020, 9, 55513). Следовательно, соединения, которые улучшают функцию митохондрий и понижающе регулируют MuRF1, предположительно защищают при саркопении и кардиомиопатии, связанных со старением.

Стресс на диафрагму при искусственной вентиляции легких (H.W. van Hees и др., *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2008, 294(6), L1260-8) или застойной сердечной недостаточности P.E. Hooijman и др., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2015, 191(10), 1126-1138) активирует систему убиквитин и протеасом, включая MuRF1 (van Hees, *Лос. цит.*; Hooijman, *Лос. цит.*). То, что это не просто корреляционные данные, подтверждается данными, что ингибирование системы протеасом с помощью бортезомида (van Hees, *Лос. цит.*), или удалением MuRF1 путем применения нокаутной модели (Hooijman, *Лос. цит.*) защищает от слабости диафрагмы (Hooijman, *Лос. цит.*). Таким образом, соединения, описанные в настоящей заявке, предположительно защищают силу сокращения диафрагмы при застойной сердечной недостаточности и при критических заболеваниях (van Hees, *Лос. цит.*; Hooijman, *Лос. цит.*).

Генетические мышечные атрофии связаны с заметной потерей мышечной ткани и потерей мышечной силы. Повышенная регуляция MuRF1 механистически вовлечена в этот процесс (J. Shin и др., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2013, 45(10), 2266-2279). В качестве специфичного примера для этого может быть упомянута немалиновая миопатия, при которой повышенная регуляция MuRF1 на уровне волокон в гликолитически активных мышечных волокон тесно коррелирует с этими волокнами и тканями, которые становятся наиболее атрофичными (F. Li и др., *Hum. Mol. Genet.*, 2015, 24(18), 5219-5233).

Было показано, что при многих типах метаболических стрессовых состояний, включая диабет, активирована MuRF1 экспрессия (S.H. Lecker и др., *FASEB J.* 2004, 18(1), 39-51). На животной модели диабета (то есть индуцированный стрептозолином диабет у мышей), было показано, что это активирует сигнальную ось Foxo-MuRF1, и это, в свою очередь, тесно коррелирует с истощением мышечной ткани (B.T. O'Neill и др., *Диабет*, 2019, 68(3), 556-570).

Тяжелое ожирение сопровождается изменением кратности циркуляции (например, инсулина и аминокислот), что оказывает влияние на синтез и разложение скелетных белков (C.S. Katsanos и др., Ожирение, 2011, 19, 469–475). Резистентность к инсулину ускоряет разложение мышечного белка путем активации пути Убиквитин-Протеасома (X. Wang, Endocrinology, 147(9), 4160–4168). В предыдущих исследованиях было показано, что вплоть до 30% потери массы может быть обусловлена уменьшением мышечной массы, используя различные модальности диеты при ожирении (D.L. Ballor и др., Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord., 1994, 18, 35–40).

Таким образом, предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к соединениям формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики миопатии критических состояний, немалиновой миопатии, воспалительной миопатии, миопатии вследствие диабета, миопатии вследствие лёгочной гипертензии, миопатии вследствие хронической сердечной недостаточности (в особенности подтипы HFrEF и HFpEF), миопатии вследствие почечной недостаточности, миопатии вследствие опухолевой кахексии, слабости диафрагмы вследствие стресса на диафрагму путем искусственной вентиляции легких или путем застойной сердечной недостаточности, врожденной миопатии, в особенности имеющей общее происхождение мышечной атрофии; связанной с возрастом саркопении и кардиомиопатии.

Настоящее изобретение в особенности относится к:

- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики миопатии критических состояний.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики немалиновой миопатии.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики воспалительной миопатии.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики миопатии вследствие диабета.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики миопатии вследствие лёгочной гипертензии.

- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики миопатии вследствие хронической сердечной недостаточности, в особенности подтипы HFrEF и HFpEF.
- 5 - Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики миопатии вследствие почечной недостаточности.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики миопатии вследствие опухолевой кахексии.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для 10 лечения или профилактики слабости диафрагмы вследствие стресса на диафрагму путем искусственной вентиляции легких или путем застойной сердечной недостаточности.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для 15 лечения или профилактики врожденной миопатии, в особенности имеющей общее происхождение мышечной атрофии.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для лечения или профилактики связанной с возрастом саркопении.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для 20 лечения или профилактики связанной с возрастом кардиомиопатии.
- Соединениям общей формулы I, как определено выше, для применения для 25 лечения или профилактики диабета.

Кроме того, было обнаружено, что, независимо от их действия на мышечные состояния, соединения I и их соли обладают благоприятным эффектом на кардиологические симптомы, связанные с систолической или 25 диастолической дисфункцией. Таким образом, настоящее изобретение также относится к соединениям I и их солям для применения для лечения или профилактики кардиологических симптомов, связанных с систолической или диастолической дисфункцией.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции 30 (то есть лекарственным средствам), содержащей по меньшей мере одно соединение, выбранное из соединений общей формулы I, как определено выше, или по меньшей мере одну его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

Эти фармацевтически приемлемые носители выбирают в соответствии с фармацевтической формой и желательным способом введения.

Соединения согласно настоящему изобретению можно использовать для приготовления фармацевтических композиций для парентерального (например, внутримышечной, внутрибрюшинной, внутривенной, интрацеребральной, интракостеральной инъекции или инфузии, подкожной инъекции, или импланта), перорального, сублингвального, интратрахеального, интраназального, местного, трансдермального, вагинального или ректального введения, и вводиться животным или людям в единичных дозированных формах, смешанных с общепринятыми фармацевтическими носителями, для профилактики или лечения вышеуказанных состояний или заболеваний.

В фармацевтических композициях, по меньшей мере одно соединение согласно настоящему изобретению может быть приготовлено отдельно или совместно с дополнительными активными соединениями, в подходящих дозированных единичных препаратах, содержащих общепринятые носители, которые обычно являются нетоксичными и/или фармацевтически приемлемыми. Носители могут представлять собой твердые, полутвердые или жидкие материалы, которые служат в качестве наполнителей, носителей или среды для активного соединения. Подходящие носители перечислены в специализированных медицинских монографиях. Дополнительно, препараты могут включать фармацевтически приемлемые носители или общепринятые вспомогательные вещества, такие как глиданты; смачивающие агенты; эмульгаторы и суспендирующие агенты; консерванты; антиоксиданты; антираздражители; хелатирующие агенты; вспомогательные вещества для покрытия; стабилизаторы эмульсии; пленкообразователи; гелеобразователи; средства, маскирующие запах; корректоры вкуса; смола; гидроколлоиды; растворители; солюбилизаторы; нейтрализующие агенты; ускорители диффузии; пигменты; соединения четвертичного аммония; пережиривающие добавки и агенты пережиривания; сырье для мазей, кремов или масел; производные силикона; вспомогательные средства для разбрасывания; стабилизаторы; стерилизаторы; суппозиторные основы; вспомогательные вещества для таблеток, такие как связующие вещества, наполнители, скользящие вещества, разрыхлители или покрытия; пропелленты; сушильные агенты; замутнители; загустители; воски; пластификаторы и белые минеральные масла. Препарат в

этом отношении основан на специальных знаниях, как описано, например, в Fiedler, H. P., Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete [Энциклопедия вспомогательных веществ для фармации, косметики и смежных областей], 4-ое изд., Aulendorf: ECV-Editio-Kantor-Verlag, 1996.

5           Подходящие единичные дозированные формы включают формы для перорального введения, такие как таблетки, желатиновые капсулы, порошки, гранулы и растворы или суспензии для перорального поглощения, формы для сублингвального, буккального, интратрахеального или интраназального введения, аэрозоли, импланты, формы для подкожного, внутримышечного или  
10           внутривенного введения и формы для ректального введения.

Соединения согласно изобретению можно использовать в кремах, мазях или лосьонах для местного введения.

Если твердая композиция приготовлена в форме таблеток, то основной компонент смешивают с фармацевтически приемлемым носителем, таким как  
15           желатин, крахмал, лактоза, стеарат магния, тальк, диоксид кремния или другие.

Таблетки могут быть покрыты оболочкой из сахарозы, производного целлюлозы или другого подходящего вещества или обработаны другим образом для проявления пролонгированной или замедленной активности и для высвобождения заранее определенного количества активного основного  
20           компонента непрерывно.

Препарат в форме желатиновых капсул получают путем смешивания активного компонента с расширителем и заключения полученной смеси в мягкие или твердые желатиновые капсулы.

Препарат в форме сиропа или эликсира или для введения в форме капель  
25           могут содержать активные компоненты совместно с подсластителем, который предпочтительно представляет собой бескалорийный, метилпарабен или пропилпарабен в качестве антисептиков, ароматизатор и подходящий краситель.

Диспергируемые в воде порошки или гранулы могут включать активные компоненты, смешанные с диспергирующими агентами, смачивающими агентами или суспендирующими агентами, такими как поливинилпирролидоны,  
30           и подсластители или улучшители вкуса.

Ректальное введение осуществляют путем применения суппозиториев, которые приготавливают со связующими, расплавляющимися при ректальной температуре, например, масло какао или полиэтиленгликоли.



Парентеральное введение осуществляют путем применения водных суспензий, изотонических солевых растворов или стерильных и инъеклируемых растворов, которые включают фармакологически подходящие диспергирующие агенты и/или смачивающие агенты, например, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль.

Активный компонент также может быть приготовлен в виде микрокапсул или липосом/центросом, если является подходящим, с одним или несколькими носителями или вспомогательными веществами.

Дополнительно к соединениям общей формулы I и их фармацевтически приемлемым солям, композиции согласно изобретению могут включать дополнительные активные компоненты, которые могут быть благоприятными для лечения нарушений или заболеваний, указанных выше.

Таким образом, настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям, в которых совместно присутствуют несколько активных компонентов, где по меньшей мере одним из них является соединение согласно изобретению.

При получении фармацевтических композиций, соединения в соответствии с изобретением необязательно смешивают или разводят с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями.

Настоящее изобретение также относится к применению соединений, выбранных из соединений общей формулы I, как определено выше, или их фармацевтически приемлемых солей для приготовления лекарственного средства для лечения или профилактики состояний, указанных выше, таких как состояния истощения мышечной ткани, как определено выше, или состояний, в особенности миопатий, которые связаны с увеличенной экспрессией Muscle RING Finger 1 (MuRF1), как определено выше, или кардиологических симптомов, связанных с систолической или диастолической дисфункцией, или диабета.

Что касается производства указанных лекарственных средств, делается ссылка на заявления, представленные в связи с вышеописанными фармацевтическими композициями.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения или предотвращения состояний, указанных выше, таких как состояние истощения мышечной ткани, как определено выше, или состояния, в особенности миопатий,

которые связаны с увеличенной экспрессией Muscle RING Finger 1 (MuRF1), как определено выше, или кардиологических симптомов, связанных с систолической или диастолической дисфункцией, или диабета, указанный способ включает стадию введения терапевтически эффективного количества соединения, выбранного из соединений общей формулы I или их фармацевтически приемлемых солей, нуждающемуся в этом субъекту.

Аналогично этому, настоящее изобретение относится к способу защиты или усиления сократительной способности диафрагмы при стрессовых состояниях, таких как длительная искусственная вентиляция легких, хирургическое вмешательство, хроническая сердечная недостаточность или первичные мышечные заболевания, указанный способ включает стадию введения терапевтически эффективного количества соединения, выбранного из соединений общей формулы I или их фармацевтически приемлемых солей, нуждающемуся в этом субъекту.

Настоящее изобретение в особенности относится к:

- Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных мышц и/или слабости диафрагмы, возникающей вследствие застойной сердечной недостаточности;
- Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей вследствие хронической сердечной недостаточности;
- Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей вследствие злокачественного новообразования;
- Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей вследствие лечения злокачественного новообразования с применением миотоксических и/или кардиотоксических веществ, таких как доксорубицин;
- Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей вследствие врожденной миопатии;
- Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей вследствие СПИДа;
- Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей вследствие хронического обструктивного заболевания легких (ХОЗЛ);

- Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей вследствие хронического заболевания почек;
- Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей вследствие почечной недостаточности;
- 5 - Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей вследствие диабета;
- Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей вследствие тяжелых ожогов;
- Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных  
10 мышц, возникающей в результате саркопении при старении;
- Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей в результате снижения кровоснабжения;
- Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных  
15 мышц, возникающей в результате временной или длительной иммобилизации;
- Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных мышц и/или слабости диафрагмы, возникающей в результате длительной искусственной вентиляции легких;
- Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных  
20 мышц, возникающей в результате денервации.
- Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей в результате продолжительного состояния невесомости;
- Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных  
25 мышц, возникающей в результате недостаточности питания;
- Способу лечения или предотвращения диабета;
- Способу лечения или предотвращения кардиологических симптомов, связанных с систолической или диастолической дисфункцией;
- указанные способы включают стадию введения терапевтически  
30 эффективного количества соединения, выбранного из соединений общей формулы I или их фармацевтически приемлемых солей, нуждающемуся в этом субъекту.

Настоящее изобретение в особенности дополнительно относится к:

- Способу лечения или предотвращения миопатии критических состояний, включая защиту сократительной способности и функции диафрагмы и при интенсивной терапии;
  - Способу лечения или предотвращения немалиновой миопатии;
  - 5 - Способу лечения или предотвращения воспалительной миопатии;
  - Способу лечения или предотвращения миопатии вследствие диабета;
  - Способу лечения или предотвращения миопатии вследствие лёгочной гипертензии;
  - Способу лечения или предотвращения миопатии вследствие хронической
  - 10 сердечной недостаточности, в особенности подтипов HFrEF и HFpEF;
  - Способу лечения или предотвращения миопатии вследствие почечной недостаточности;
  - Способу лечения или предотвращения миопатии вследствие опухолевой кахексии;
  - 15 указанные способы включают стадию введения терапевтически эффективного количества соединения, выбранного из соединений общей формулы I или их фармацевтически приемлемых солей, нуждающемуся в этом субъекту.
- Настоящее изобретение специфически относится к:
- 20 - Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей в результате или связанной с сердечной недостаточностью со сниженной фракцией выброса (HF-rEF).
  - Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных
  - 25 мышц, возникающей в результате или связанной с сердечной недостаточностью с сохранённой фракцией выброса (HF-pEF).
  - Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей в результате или связанной с гипертонией.
  - Способу лечения или предотвращения атрофии скелетных или сердечных
  - 30 мышц, возникающей в результате или связанной с опухолевой кахексией.
  - Способу лечения или предотвращения мышечной атрофии и/или кардиотоксичности, индуцированной Доксорубицином.
  - Способу лечения или предотвращения саркопении и/или кардиомиопатии при старении.

- Способу лечения или предотвращения мышечной атрофии вследствие хронического заболевания почек.
- Способу лечения или предотвращения слабости диафрагмы вследствие искусственной вентиляции легких или застойной сердечной недостаточности.
- Способу лечения или предотвращения врожденной миопатии, в особенности, имеющей общее происхождение мышечной атрофии.
- Способу лечения или предотвращения индуцированной диабетом мышечной атрофии.
- Способу лечения или предотвращения диабета.
- Способу лечения или предотвращения кардиологических симптомов, связанных с систолической или диастолической дисфункцией.

Термин "субъект, нуждающийся в этом", как используется в настоящей заявке, относится к субъекту, который страдает от одного или нескольких вышеуказанных состояний или заболеваний, или относится к субъекту, у которого существует вероятность развития одного или нескольких вышеуказанных состояний или заболеваний. Предпочтительно, термин "субъект, нуждающийся в этом", относится к млекопитающему, в особенности человеку, продуктивному животному или домашнему животному. В особенности, термин "субъект, нуждающийся в этом", относится к человеку.

Термины "эффективное количество" и "терапевтически эффективное количество", как используется в настоящей заявке, обозначает количество данного соединения, которое вызывает биологическую или медицинскую ответную реакцию ткани, системы, животного или человека, который предполагает получить исследователь, ветеринар, врач или другой клиницист. Общеизвестно, что квалифицированный специалист в данной области техники может оказывать влияние на состояния истощения мышечной ткани и/или миопатии путем лечения пациента, который в настоящее время страдает от этих расстройств, или путем профилактического лечения пациента, который страдает от этих расстройств, с помощью эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению.

Термины "лечение" и "лечить", как используется в настоящей заявке в связи со способами, как описано выше, относится ко всем процессам, где может происходить замедление, прерывание, купирование, контролирование или

остановка прогрессирования состояния истощений мышечной ткани и/или миопатий, как описано в настоящей заявке, но не обязательно указывает на полную элиминацию всех симптомов этих состояний или нарушений, а также профилактическую терапию указанных состояний, в особенности у пациента, который предрасположен к развитию таких состояний или нарушений.

Термин "композиция", как используется в настоящей заявке, охватывает продукт, содержащий указанные компоненты в указанных количествах, а также любой продукт, который получают, непосредственно или опосредованно, из комбинации указанных компонентов в указанных количествах. Такой термин по отношению к фармацевтической композиции, охватывает продукт, содержащий активный (е) компонент (ы), и инертный (е) компонент (ы), который (е) составляет (ют) носитель (и), а также любой продукт, который получают, непосредственно или опосредованно, из комбинации, комплексообразования или агрегации любых двух или более компонентов, или при диссоциации одного или нескольких компонентов, или при реакциях или взаимодействиях других типов одного или нескольких компонентов. Таким образом, фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению охватывают любую композицию, полученную путем смешивания соединения согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемого носителя.

Под "фармацевтически приемлемым" понимают, что носитель, разбавитель или наполнитель должен быть совместим с другими компонентами препарата и не наносить вреда реципиенту.

Термины "введение соединения" и/или "вводимое соединение" должны пониматься как обеспечение соединения согласно изобретению или пролекарства соединения согласно изобретению индивидууму, нуждающемуся в лечении.

Для лечения и/или профилактики вышеописанных состояний истощения мышечной ткани и миопатий, которые связаны с повышенной экспрессией MuRF1, подходящий уровень дозирования обычно будет составлять приблизительно от 2 до 500 мг в сутки на кг веса тела субъекта, нуждающегося в этом, который можно вводить в однократных или многократных дозах. Предпочтительно, уровень дозирования будет составлять приблизительно от 5 до приблизительно 250 мг/кг в сутки.

Для перорального введения, композиции предпочтительно обеспечиваются в форме таблеток, содержащих от 10 до 5000 миллиграмм активного компонента, в особенности 50,0; 100,0; 200,0; 500,0; 1000,0; 2000,0; 3000,0; 4000,0 и 5000,0 миллиграмм активного компонента для симптоматической корректировки дозировки субъекту, нуждающемуся в этом.

Этот режим дозирования можно корректировать для обеспечения оптимального терапевтического ответа. Тем не менее, подразумевается, что конкретный уровень дозы и частота дозировки для любого конкретного пациента может изменяться и будет зависеть от различных факторов, включая активность конкретного применяемого соединения, метаболической стабильности и продолжительности действия этого соединения, возраста, веса тела, общего состояния здоровья, пола, питания, способа и времени введения, скорости выведения, комбинации лекарственных средств, тяжести конкретного состояния, и хозяина, подвергаемого терапии.

Соединения согласно настоящему изобретению могут вводиться общепринятыми путями введения, включая парентеральный (например, внутримышечную, внутривенную, интрацеребральную, интракостальную инъекцию или инфузию, подкожную инъекцию, или имплант), пероральный, путем ингаляционного спрея, назальный, вагинальный, ректальный, сублингвальный, или местный пути введения.

Соединения в соответствии с настоящим изобретением также пригодны в способе лечения и/или профилактики вышеуказанных заболеваний и состояний в комбинации с другими агентами.

Соединения согласно настоящему изобретению могут применяться в комбинации с одним или несколькими другими лекарственными средствами для лечения и/или профилактики вышеуказанных заболеваний и состояний, для которых могут быть полезными соединения формулы I или другие лекарственные средства, где комбинация лекарственных средств вместе является безопасной или более эффективной, чем любое лекарственное средство отдельно. Такое (ие) другое (ие) лекарственное (ые) средство (а) может (ут) вводиться, путем и в количестве, в котором обычно используется, одновременно или последовательно с соединением формулы I. Если соединение формулы I используется одновременно с одним или несколькими другими лекарственными средствами, то предпочтительной является фармацевтическая композиция в

единичной дозированной форме, содержащая такие другие лекарственные средства и соединение формулы I. Тем не менее, комбинированная терапия также может включать терапии, в которых соединение формулы I и одно или несколько других лекарственных средств вводят с применением разных 5 перекрывающихся схем. Также предполагается, что когда используют в комбинации с одним или несколькими другими активными компонентами, то соединения согласно настоящему изобретению и другие активные компоненты можно использовать в более низких дозах, чем каждое из них используется самостоятельно. Вышеуказанные комбинации включают комбинации 10 соединений согласно настоящему изобретению не только с одним другим активным соединением, но также и с двумя или более другими активными соединениями.

Весовое соотношение соединения соединения согласно настоящему изобретению ко второму активному компоненту может изменяться и будет 15 зависеть от эффективной дозы каждого компонента. Как правило, будут использовать эффективную дозу каждого компонента. Следовательно, например, если соединение согласно настоящему изобретению комбинируют с другим агентом, то весовое соотношение соединения согласно настоящему изобретению к другому агенту обычно будет находиться в диапазоне от приблизительно 20 1000:1 до приблизительно 1:1000, предпочтительно от приблизительно 200:1 до приблизительно 1:200. Комбинации соединения согласно настоящему изобретению и других активных компонентов также в целом будут находиться в вышеуказанном диапазоне, но в каждом случае, следует применять эффективную дозу каждого активного компонента. В таких комбинациях соединение согласно 25 настоящему изобретению и другие активные агенты могут вводиться отдельно или совместно. Дополнительно, введение одного элемента может осуществлять перед, конкурентно, или после введения другого (их) агента (ов).

Последующие примеры и фигуры предназначены для дальнейшей иллюстрации настоящего изобретения.

30 Сокращения:

ALPHA Гомогенный анализ усиления люминесценции при сближении;  
DSF Дифференциальная сканирующая флуориметрия;  
GST Глутатион-S-трансфераза;



	UBE1	Рекомбинантный активирующий фермент His6-Убиквитина человека;
	DMCO	Диметилсульфоксид;
	CDI	1,1'-Карбонилдиимидазол;
5	DMEM	Среда Игла в модификации Дульбекко;
	Ложн.	обработанный солевым раствором;
	DEX	дексаметазон;
	PBS	фосфатно-солевой буферный раствор;
	MCT	монокроталин;
10	TA	передняя большеберцовая мышца;
	TL	длина большеберцовой кости;
	EDL	длинный разгибатель пальцев;
	CSA	площадь поперечного сечения;
	LAD	лигирование левой передней правой коронарной артерии;
15	MI	Инфаркт миокарда;
	WB	вестерн-блоттинг;
	BW	вес тела;
	CHF	хроническая сердечная недостаточность;
	LV	левый желудочек;
20	LVEDD	конечно-диастолический диаметр левого желудочка;
	LVEF	фракция выброса левого желудочка;
	LVEDS	конечно-систолический диаметр левого желудочка;
	LVFS	фракция сокращения левого желудочка;
	MRPS-5	митохондриальный рибосомный белок 5;
25	Nox 2	NADPH оксадаза 2;
	CS	Цитратсинтаза;
	SDH	Сукцинатдегидрогеназа;
	ТОМ-20	Транслоказа наружной митохондриальной мембраны 20;
	GAPDH	Глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа;
30	AU	произвольная единица;
	HPRT	гипоксантин-фосфорибозилтрансфераза;
	FRET	Резонансный перенос энергии флуоресценции;
	MAFbx	Мышечная атрофия F-box;
	CARP	Сердечный адриамицин-отвечающий белок;

	GAPDH	Глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа;
	eIF2B-delta	Дельта субъединица фактора инициации трансляции eIF-2B;
	AS3MT	Арсенит метилтрансфераза;
	ATPAF1	Фактор сборки митохондриального комплекса F1 АТФ-синтазы 1;
5	GHDC	GH3 домен-содержащий белок;
	BAX	Регулятор апоптоза BAX.

Фигуры:

10 Фигура 1: Результаты теста на цитотоксичность на основе высвобождения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в культивируемых миобластах в присутствии возрастающих концентраций соединений MyoMed-946, MyoMed-946-5, MyoMed-946-8.

15 Фигура 2: Результаты теста на цитотоксичность на основе высвобождения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в культивируемых миоцитах в присутствии возрастающих концентраций соединений MyoMed-946, MyoMed-946-5, MyoMed-946-8.

20 Фигуры 3 - 7: Физические характеристики ложн. (n=20) и мышей, леченных с применением монокроталинового корма или с нормальным питанием (МСТ; n=27) или MyoMed-946 соединением (МСТ+ MyoMed-946; n=27). Данные подтверждали, что лечение МСТ индуцирует сердечную кахексию независимо от введения корма, как продемонстрировано с помощью нарушенного прироста массы (Фигура 3), увеличенного застоя крови в легких (Фигура 4) и увеличенного веса сердца по сравнению с весом тела (BW) (Фигура 5), и что гипертрофия правого желудочка (RV) (Фигура 6), последняя визуализируется по репрезентативно H&E окрашенным медиальным поперечным сечениям сердца (Фигура 7), истончена. \*P<0,01 отн. Ложн.

30 Фигуры 8 - 12: Сырая масса скелетных мышц (нормированная к длине большеберцовой кости; TL) для длинного разгибателя пальцев (EDL) (Фигура 8), камбаловидной мышцы (Фигура 9), передней большеберцовой мышцы (TA) (Фигура 10) для МСТ-леченных мышей при отсутствии или в присутствии MuRF1 ингибитора MyoMed-946. Дополнительно также представлена площадь поперечного сечения волокон (CSA) для TA мышцы (Фигура 11), последняя визуализируется путем репрезентативного H&E окрашивания (Фигура 12). \*P<0,05 отн. ложн.; §P<0,01 отн. ложн. и МСТ + MyoMed-946.

5 Фигуры 13 - 18: Физические характеристики ложн. (n=10) и мышей, леченных с применением монокроталинового корма или с нормальным питанием (МСТ; n=10) или MuRF1 ингибиторов MyoMed-946 (МСТ + MyoMed-946; n=10), MyoMed-203 (МСТ + MyoMed-203; n=10) и MyoMed-205 (МСТ + MyoMed-205; n=10). Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная погрешность среднего. Фигура 13: \*\*\* p<0,001 отн. нач.; Фигура 14: \*\*\* p<0,001 отн. ложн. \*\* p<0,01 отн. ложн.; Фигура 15: \*\*\* p<0,001, \*\* p<0,01 отн. ложн., §§ p<0,01, § p<0,05 отн. МСТ; Фигуры 16 to 18: \*P<0,01 отн. Ложн. Данные подтверждали, что лечение МСТ индуцирует сердечную кахексию независимо от

10 введения корма, как продемонстрировано с помощью нарушенного прироста массы (Фигура 13), увеличенного застоя крови в легких (Фигура 14) и увеличенного веса сердца по сравнению с весом тела (BW) (Фигура 15), и что гипертрофия правого желудочка (RV) ослаблена с помощью MuRF1 ингибиторов MyoMed-946, MyoMed-203 и MyoMed-205 (Фигуры 16 - 18).

15 Фигуры 19 и 20: Сырая масса скелетных мышц (нормированная к длине большеберцовой кости; TL) для длинного разгибателя пальцев (EDL) (Фигура 19) и передняя большеберцовая мышца (TA) (Фигура 20) для МСТ-леченных мышей при отсутствии (Ложн.) или в присутствии MuRF1 ингибиторов MyoMed-946, MyoMed-203 и MyoMed-205.

20 Фигура 21: Максимальная сила диафрагмы для МСТ-леченных мышей при отсутствии (Ложн.) или в присутствии MuRF1 ингибиторов MyoMed-946, MyoMed-203 и MyoMed-205.

25 Фигуры 22 и 23: Экспрессия MuRF1 (Фигура 22) и телетонина (Фигура 23) в мышечной ткани передней большеберцовой мышцы мышей, леченных МТС, при отсутствии (Ложн.) или в присутствии MuRF1 ингибиторов MyoMed-946, MyoMed-203 и MyoMed-205.

30 Фигуры 24 - 27: Функция диафрагмы, оцененная во время изометрических сокращений (Фигура 24) и также изотонических сокращений (Фигура 25) пучков мышечных волокон диафрагмы от мышей, страдающих вследствие хронической сердечной недостаточности (CHF) со сниженной фракцией выброса (HFrEF) после инфаркта миокарда (MI), таким образом определяли максимальную силу диафрагмы (Фигура 26) и пиковую мощность диафрагмы (Фигура 27). Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная погрешность среднего. \*P

< 0,05, \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  отн. CHF, § $P < 0,05$ , и §§ $P < 0,01$  отн. CHF + MyoMed-946.

5 Фигуры 28 - 30: *In vitro* сократительная функция скелетных мышц, оцененная во время изометрических сокращений (Фигура 28) и также изотонических сокращений, таким образом определяли скорость укорочения (Фигура 29) и мощность (Фигура 30). Мыши, леченные МСТ, продемонстрировали нарушения скорости укорочения и мощность приблизительно на 20 % по сравнению с ложными. Эти нарушения были существенно предотвращены у МСТ мышей, которых кормили MyoMed-946 соединением. \* $P < 0,05$  отн. ложн.; § $P < 0,01$  отн. ложн. и МСТ+ MyoMed-946.

10 Фигура 31: Сырая масса мышц передней большеберцовой мышцы (ТА) в В16F10 клетках инокулированных мышей получавших регулярный корм (опухоль) и В16F10 клетках инокулированных мышей, которых кормили соединениями MyoMed-946 (опухоль + MyoMed-946) и MyoMed-205 (опухоль + MyoMed-205).

15 Фигура 32: Тест вытяжения на проволоке на В16F10 клетках инокулированных мышей (модель опухолевых клеток меланомы), 9d, 16d и 23d после инокуляции. Рост опухоли приводил к существенному уменьшению мышечной функции (опухолевая группа) по сравнению с мышами контрольной группы (ложн.). Это уменьшение мышечной функции ослаблено у мышей, которых кормили соединениями MyoMed-946 (опухоль + MyoMed-946) и MyoMed-205 (опухоль + MyoMed-205).

20 Фигура 33 - 35: Уровни экспрессии eIF2B дельта-субъединицы (Фигура 33) и ВАХ (Фигура 34) для ложн., МСТ, и МСТ+ MyoMed-946 мышей, определенных с помощью анализа вестерн-блоттинг, с репрезентативными блотами (Фигура 35). \* $P < 0,05$  отн. ложн.; § $P < 0,01$  отн. МСТ.

25 Фигура 36 - 38: Уровни экспрессии белка и репрезентативные вестерн-блоттинги для MuRF1 (Фигура 36), MAFBx (Фигура 37), и CARP (Фигура 38) для ложн., МСТ, и МСТ+ MyoMed-946 мышей. Обработка МСТ приводит к повышению экспрессии MuRF1 и CARP, но это ослаблено у мышей, получавших питание с MyoMed-946 соединением. Не было обнаружено изменение уровней MAFBx. \* $P < 0,05$  отн. ложн. и МСТ+ MyoMed-946.

30 Фигура 39: Уровни экспрессии белка и репрезентативные вестерн-блоттинги для MRPS-5 в ткани диафрагмы для ложн., CHF, и CHF + MyoMed-946 мышей.

Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная погрешность среднего.

5 Фигуры 40 - 42: Уровни экспрессии белка и репрезентативные вестерн-блоттинги для MuRF1 (Фигура 40), MuRF2 (Фигура 41), и Телетонина (Фигура 42) в ткани диафрагмы для ложн., CHF, и CHF + MyoMed-946 мышей. CHF приводит к повышению экспрессии MuRF1 и MuRF2 и к снижению экспрессии телетонина, но эти эффекты ослаблены у мышей, получавших питание с MyoMed-946 соединением. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная погрешность среднего.

10 Фигуры 43 - 46: Уровни экспрессии белка MuRF1, определенные с помощью анализа вестерн-блоттинг (WB) (Фигура 43), Nox 2 (Фигура 44) и LC3 I/II (Фигура 46), а также уровень нитротирозина, маркера активных форм кислорода (Фигура 45) в мышечной ткани в B16F10 клетках инокулированных мышей, получавших питание обычным кормом (опухоль) или, которых кормили соединениями MyoMed-946 (опухоль + MyoMed-946) или MyoMed-205 (опухоль + MyoMed-205). Рост опухоли приводил к существенному увеличению уровней экспрессии белка MuRF1 и Nox 2, а также уровня нитротирозина, и к существенному снижению уровней экспрессии LC3 I/II в опухолевой группе по сравнению с мышами контрольной группы (ложн.). Эти изменения ослаблены у мышей, которых кормили соединениями MyoMed-946 (опухоль + MyoMed-946) или MyoMed-205 (опухоль + MyoMed-205). Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная погрешность среднего.

20 Фигуры 47 - 49: Активности ферментов цитратсинтазы (Фигура 47), сукцинатдегидрогеназы (Фигура 48) и митохондриального комплекса I (Фигура 49) в образцах ткани диафрагмы от ложн., хронической сердечной недостаточности (CHF), и CHF + MyoMed-946 мышей. Данные продемонстрировали существенную понижающую регуляцию активности цитратсинтазы, сукцинатдегидрогеназы и митохондриального комплекса I у CHF по сравнению с ложн., но это ослаблено у мышей, которых кормили соединением MyoMed-946. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная погрешность среднего.

30 Фигуры 50 и 51: Уровни экспрессии белка митохондриального порина внешней митохондриальной мембраны (Фигура 50) и TOM-20 (Фигура 51) в образцах ткани диафрагмы от ложн., хронической сердечной недостаточности (CHF), и

CHF + MyoMed-946 мышей. Данные продемонстрировали существенную понижающую регуляцию порина и TOM-20 экспрессии у CHF по сравнению с ложн., но это ослаблено у мышей, которых кормили соединением MyoMed-946. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная погрешность среднего.

5  
10  
15  
Фигуры 52 и 53: Активности ферментов цитратсинтазы (Фигура 52) и митохондриального комплекса I (Фигура 53) в образцах мышечной ткани от ложн., B16F10 клетках инокулированных мышей, получавших питание обычным кормом (опухоль) и B16F10 клетках инокулированных мышей, которых кормили соединениями MyoMed-946 (опухоль + MyoMed-946) или MyoMed-205 (опухоль + MyoMed-205). Данные продемонстрировали существенную понижающую регуляцию активности цитратсинтазы и митохондриального комплекса I в опухолевой группе по сравнению с ложн., но это ослаблено у мышей, которых кормили соединениями MyoMed-946 или MyoMed-205. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная погрешность среднего.

20  
Фигура 54: Экспрессия MuRF1 на уровне мРНК в мышечных трубочках, после инкубирования в течение 24 ч с дексаметазоном (DEX; 10 мкмоль/л). Представлена кратность изменения необработанных клеток (DEX), и клеток, которые были предварительно обработаны в течение 2 ч с применением MyoMed-946 соединения при концентрациях 0,1 мкмоль/л и 10 мкмоль/л. Предварительно обработанные клетки продемонстрировали уменьшенные уровни мРНК MuRF1. \*P<0,05 отн. CON. §P<0,05 отн. DEX.

25  
30  
Фигура 55: Кривые плавления дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF), графически представленные в виде соотношения сигнала флуоресценции при 350 нм к сигналу флуоресценции при 330 нм относительно градиента температуры, для центрального фрагмента MuRF1 в PBS-буфере (сплошная линия), MuRF1 центрального фрагмента в PBS-буфере плюс 1% ДМСО (пунктирная линия) и для MuRF1 центрального фрагмента в PBS-буфере плюс 1% 10 мМ маточного соединения MyoMed-946 в ДМСО (конечная концентрация MyoMed-946: 100 мкМ) (точечная линия).

Фигура 56: Схематическое изображение схемы исследования на экспериментальной модели HFpEF у крыс.

Фигура 57: Результаты эхокардиографии функции миокарда и инвазивных гемодинамических измерений на экспериментальной модели HFpEF у крыс.

Фигура 58: Результаты измерений массы и функции скелетных мышц на экспериментальной модели HFpEF у крыс.

Фигура 59: Результаты кахексии и внутреннего напряжения на мышинной модели мышечной атрофии и кардиотоксичности, индуцированной Доксорубицином.

5 Фигура 60: Результаты эхокардиографии на мышинной модели мышечной атрофии и кардиотоксичности, индуцированной Доксорубицином.

Фигура 61: Тест вытяжения на проволоке у тучных мышей с диабетом 2 типа во время индуцированной диетой потери веса. Лечение с применением MyoMed-205 ослабляло потерю мышечной функции.

10 Фигура 62: Уровни глюкозы в крови после голодания в течение 6 ч у MyoMed-203-леченных DIO мышей по сравнению с DIO контрольными мышами.

Фигуры 63 и 64: Результаты перорального глюкозотолерантного теста в тестируемые дни 14 и 28 у MyoMed-203-леченных DIO мышей по сравнению с DIO контрольными мышами.

15 Фигура 65: Тест на толерантность к инсулину результаты у MyoMed-203-леченных DIO мышей по сравнению с DIO контрольными мышами.

## I. Синтез соединений I

### 1. Аналитические методы

20 Соединения характеризовали с помощью  $^1\text{H}$  ЯМР и иногда  $^{13}\text{C}$  ЯМР в  $d_6$ -диметилсульфоксиде (DMSO- $d_6$ ), если специально не указано иначе, на приборе 400 МГц ЯМР (Bruker AVANCE III).

25 Спектральные свойства ядерного магнитного резонанса (ЯМР) относятся к химическим сдвигам ( $\delta$ ), выраженным в виде част. на миллион (част. на млн). Относительная площадь сдвигов в  $^1\text{H}$  ЯМР спектре соответствует числу атомов водорода для конкретного функционального типа в молекуле. Природа сдвига, что касается мультиплетности, указана как синглет (s), широкий синглет (s. br.), дублет (d), широкий дублет (d br.), триплет (t), широкий триплет (t br.), квартет (q), квинтет (quint.) и мультиплет (m).

30 Соединения дополнительно характеризовали с помощью ВЭЖХ-МС и/или СВЭЖХ-МС в быстром градиенте на  $\text{C}_{18}$ -материале (режим электрораспыление-ионизация (ИЭР)). Если специально не указано иначе, ИЭР МС-данные записывали в положительном режиме. МС-данные относятся к протонированным соединениям  $(\text{M}+\text{H})^+$ , представленным в виде массы по отношению к заряду ( $m/z$ ), где  $z$  равен 1.

ВЭЖХ-МС спецификации:

ВЭЖХ-МС Прибор: Agilent 1100 Series ЖХ/MCD система с DAD\ELSD и Agilent LC\MSD VL (G1956A), SL (G1956B) масс-спектрометр или Agilent 1200 Series ЖХ/MCD система с DAD\ELSD и Agilent LC\MSD SL (G6130A), SL (G6140A) масс-спектрометр. Все данные ЖХ/МС получали, используя переключение положительных/отрицательных режимов.

Метод сбора данных: Колонка: Zorbax SB-C18 1,8 мкм 4,6x15 мм Rapid Resolution картридж (PN 821975-932). Подвижная фаза: А: ацетонитрил плюс 0,1% муравьиная кислота; В: вода с 0,1% муравьиной кислотой. Скорость потока: 3 мл/мин; Вводимый объем: 1 мкл.

Градиент растворителей:

100% В от 0 до 0,01 минуты;

100% до 0% В от 0,01 до 1,5 минут, линейный градиент;

0% В от 1,5 до 1,8 минут;

0% до 100% В от 1,8 до 1,81 минут.

Режим ионизации: химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI);

Диапазон сканирования: m/z 80-1000.

СВЭЖХ-МС спецификации:

СВЭЖХ-МС прибор: Agilent Infinity 1290 с Single Quadrupole, Ионизация электрораспылением масс-спектрометр;

Метод сбора данных: Колонка: Acquity UPLC BEH C18; 1,7 мкм; 2,1x50 мм; T=40°C. Подвижная фаза: А: Вода плюс 0,1% трифторуксусная кислота; В: MeCN плюс 0,1% трифторуксусная кислота. Скорость потока: 1 мл/мин; Вводимый объем 3 мкл; время прогона 3 мин.

Градиенты растворителей (градиент 3 минуты):

5 до 100 % В от 0 до 2,3 минут, линейный градиент;

100% В от 2,3 до 2,5 минут;

100 до 5 % В от 2,5 до 2,6 минут, линейный градиент;

100% В от 2,6 до 3,0 минут.

Если специально не указано иначе, ИЭР МС-данные записывали в положительном режиме. МС-данные относятся к протонированным соединениям  $(M+H)^+$ , представленные в виде массы по отношению к заряду (m/z), где z равен 1.



## 2. Синтез

### 2.1 Препаративная ВЭЖХ-очистка

Осуществляли препаративную ВЭЖХ-очистку, используя ВЭЖХ (H<sub>2</sub>O–MeOH или H<sub>2</sub>O–CH<sub>3</sub>CN; Agilent 1260 Infinity системы, оборудованные с DAD и масс-детекторы, используя Waters SunFire C18 OBD Prep Column (100Å, 5 мкм, 19 мм X 100 мм с SunFire C18 Prep Guard Cartridge, 100Å, 10 мкм, 19 мм X 10 мм). Неочищенные соединения растворяли в 0,7 мл ДМСО. Поток: 30 мл/мин. Чистоту полученных фракций проверяли с помощью аналитической ЖХМС. Спектры записывали для каждой фракции, как они были получены непосредственно после хроматографии в растворенной форме. Растворитель упаривали в потоке N<sub>2</sub> при 80°C. Индивидуальные фракции объединяли на основании постхроматографического ЖХМС анализа. Твердые фракции растворяли в 0,5 мл MeOH/CH<sub>3</sub>CN и переносили в предварительно взвешенные маркированные флаконы. Полученные растворы снова упаривали в потоке N<sub>2</sub> при 80°C. После высушивания, продукты в завершение характеризовали с помощью ЖХ-МС и <sup>1</sup>H-ЯМР.

### 2.2 Промежуточные соединения

#### 2.2.1 4-[(4-Метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]уксусная кислота

Смесь 80,6 г (0,458 моль) 7-гидрокси-4-метилкумарина, 110,1 г метил 4-(бромметил)бензоата (0,480 моль), и безводного K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 95 г (0,686 моль) в безводном ацетоне (800 мл) нагревали в колбе с обратным холодильником в течение 3 часов. После этого смесь охлаждали, фильтровали, и фильтрат концентрировали в вакууме. Осадок растворяли в ДМСО (450 мл) и добавляли водный раствор гидроксида калия (200 мл, 20% KOH). Полученную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 72 часов. После завершения гидролиза добавляли 1 л воды и раствор подкисляли с помощью 10% соляной кислоты до pH=1-2. Образованный осадок фильтровали и высушивали в вакууме, получая очищенный продукт. Выход 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]уксусной кислоты составил 75% (106 г).

ВЭЖХ-МС (положительный режим): m/z 311 (M+H)<sup>+</sup>; Время удерживания: 1,11 мин.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>, част. на млн): δ = 13,01 (br s, 1H), 8,0-7,97 (m, 2H), 7,71 (d, J = 7,0 Гц, 1H), 7,60-7,58 (m, 2H), 7,09-7,05 (m, 2H), 6,23 (s, 1H), 5,34 (s, 2H), 2,40 (s, 3H).

### 2.2.2 2-Амино-N-(2-фурилметилкарбамоил)ацетамид

Смесь 1,46 г (6,74 ммоль) 2-хлор-N-(2-фурилметил-карбамоил)ацетамида и азид натрия 90 мг ( $\text{NaN}_3$ , 2 экв.) в 15 мл этанола перемешивали при 70°C в течение ночи. После охлаждения до комнатной температуры твердые вещества удаляли и полученный фильтрат концентрировали *в вакууме* (1/3 объема). Осадок распределяли между EtOAc и водой. Органический слой промывали соевым раствором, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали *в вакууме*. Осадок растворяли в MeOH, и к нему Pd/C добавляли. Смесь дегазировали, и предоставляли возможность перемешиваться при КТ в атмосфере водорода в течение ночи. Катализатор удаляли, и фильтрат упаривали и высушивали *в вакууме*, получая неочищенный амин, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. (X=O 0,8 г 60%; X=O 0,7 г 62% (из 2 стадий)).

### 2.2.3 2-Амино-N-(2-тиенилметилкарбамоил)ацетамид

2-Амино-N-(2-тиенилметилкарбамоил)ацетамид приготавливали аналогично примеру 2.2.2, за исключением того, что 1,26 г (5,41 ммоль) 2-хлор-N-(2-тиенилметилкарбамоил)-ацетамид использовали в качестве исходного вещества вместо 2-хлор-N-(2-фурилметил-карбамоил)ацетамида. Таким образом полученный неочищенный 2-амино-N-(2-тиенилметил-карбамоил)ацетамид использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Выход: 0,7 г 62% (из 2 стадий).

## 2.3 Соединения I

### ПРИМЕР 1

Синтез [2-(2-фурилметилкарбамоиламино)-2-оксо-этил] 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензоата (MyoMed-946)

Смесь 310 мг (1,0 ммоль) 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]-уксусной кислоты, 228 мг (1,05 ммоль) 2-хлор-N-(2-фурилметилкарбамоил)ацетамида, 75 мг (0,5 ммоль) NaI, и DIPEA 155 мг (1,2 ммоль) растворяли в 6 мл ДМСО. Полученную взвесь перемешивали в течение 72 часов при комнатной температуре до завершения реакции; превращение контролировали с помощью ЖХ-МС. После этого реакционную смесь вливали в 50 мл воды, полученный осадок фильтровали и промывали с дополнительной порцией воды, изопропилового спирта, и гексана последовательно. Твердый продукт высушивали в вакууме. Выход [2-(2-фурилметилкарбамоиламино)-2-

оксо-этил] 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)окси-метил]бензоата (MyoMed-946) составил 61% (289 мг).

[2-(2-Фурилметилкарбамоиламино)-2-оксо-этил] 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензоат (MyoMed-946) не показал следов разложения при хранении в течение нескольких месяцев при комнатной температуре (подтверждено с помощью ЯМР и ЖХ-МС).

ВЭЖХ-МС (Положительный режим):  $m/z$  491/492 ( $M+H$ )<sup>+</sup>; Время удерживания: 1,436 мин.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>, част. на млн):  $\delta$  = 10,50 (br.s, 1H, NH), 7,85 (br.s, 1H, NH), 7,55 (d, J = 8,0 Гц, 2H, CH+CH), 7,22 (d, J = 8,4 Гц, 1H, CH), 7,15 (d, J = 8,0 Гц, 2H, CH+CH), 7,09 (s, 1H, CH), 6,60 (m, 2H, CH+CH), 5,90 (m, 1H, CH), 5,78 (d, J = 1,4 Гц, 1H, CH), 5,74 (s, 1H, CH), 4,87 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4,44 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3,88 (d, J = 5,2 Гц, 2H, NCH<sub>2</sub>), 1,91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

*Дальнейшая аналитическая характеристика MyoMed-946*

Чистоту и идентичность соединения дополнительно оценивали, используя 1D и 2D ЯМР и СВЭЖХ-МС, как описано ниже:

Для ЯМР анализа, 2 мг MyoMed-946 растворяли в 1 мл d<sub>6</sub>-диметилсульфоксида со следовыми количествами CCl<sub>4</sub>. <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-спектры записывали, также как и COSY и HSQC 2D-ЯМР спектры для вычисления <sup>1</sup>H-ЯМР пика.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub> + CCl<sub>4</sub>):  $\delta$  = 10,68 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 8,05 (d, J = 7,37 Гц, 2H), 7,53-7,45 (m, 4H), 7,14-6,91 (m, 2H), 6,40 (s, 1H), 6,30-6,16 (m, 2H), 5,37 (s, 2H), 4,94 (s, 2H), 4,44-4,23 (m, 2H), 2,41 (s, 3H).

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub> + CCl<sub>4</sub>):  $\delta$  = 169,0, 165,1, 161,0, 160,0, 154,6, 153,3, 152,5, 151,8, 142,3 (2C), 129,6 (2C), 128,5, 127,6 (2C), 126,6, 113,5, 112,6, 111,4, 110,4, 107,0, 101,8, 69,1, 62,7, 36,0, 18,1.

Для СВЭЖХ-МС анализ, небольшое количество MyoMed-946 растворяли в ацетонитриле (MeCN) и 3 мкл этого раствора инъецировали на C18 UPLC колонку (Acquity UPLC VEN C18; 1,7 мкм; 2,1x50 мм). Использовали СВЭЖХ-МС систему и аналитический метод, как описано выше.

СВЭЖХ-МС (положительный режим):  $m/z$  = 491,1 ( $M+H$ )<sup>+</sup>; Время удерживания: 1,7 мин.

## ПРИМЕР 2:

Синтез (1-метил-2-оксо-2-уреидо-этил) 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензоата (MyoMed-946-5)

Синтез осуществляли аналогично Примеру 1, за исключением того, что N-карбамоил-2-хлор-пропанамид использовали вместо 2-хлор-N-(2-фурилметил-карбамоил)ацетамида.

ВЭЖХ-МС (Положительный режим): m/z 439 (M+H)<sup>+</sup>; Время удерживания 1,388 мин.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>, част. на млн): δ = 10,63 (br.s, 1H), 8,05-7,98 (m, 3H), 7,72-7,68 (m, 1H), 7,68-7,59 (m, 2H), 7,05-7,01 (m, 2H), 6,23 (s, 1H), 5,35 (s, 2H), 5,22-5,14 (m, 1H), 2,70 (d, 3H), 2,39 (s, 3H), 1,50 (d, 3H).

## ПРИМЕР 3:

Синтез [1-метил-2-(метилкарбамоиламино)-2-оксо-этил] 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензоата (MyoMed-946-8)

Синтез осуществляли аналогично Примеру 1, за исключением того, что 2-хлор-N-(метилкарбамоил)пропанамид использовали вместо 2-хлор-N-(2-фурилметил-карбамоил)ацетамида.

ВЭЖХ-МС (Положительный режим): m/z 425 (M+H)<sup>+</sup>; Время удерживания 1,327 мин.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>, част. на млн): δ = 10,51 (br.s, 1H), 8,06-7,97 (m, 2H), 7,73-7,67 (m, 1H), 7,67-7,59 (m, 2H), 7,54 (br, s, 1H), 7,33 (br, s, 1H), 7,09-7,02 (m, 2H), 6,22 (s, 1H), 5,35 (s, 2H), 5,22-5,14 (m, 1H), 2,39 (s, 3H), 1,51 (d, 3H).

## ПРИМЕР 4:

Синтез N-[2-(2-фурилметилкарбамоиламино)-2-оксо-этил]-4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензамида

К охлажденному раствору 2-амино-N-(2-фурилметилкарбамоил)ацетамида, полученного в примере 2.2.2 (0,6 ммоль), по каплям добавляли 558 мг (1,8 ммоль) 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]-уксусной кислоты, 1-гидрокси-7-азабензотриазола 109 мг (НОАт, 0,8 ммоль) в 2 мл ДМФА, EDC 124 мг (0,8 ммоль), и смеси предоставляли возможность перемешиваться при комнатной температуре в течение ночи. Образованный осадок собирали, промывали метанолом, затем водой, снова метанолом и высушивали, получая 110 мг указанного в заглавии соединения с выходом: 37%.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $\text{D}_6$ , част. на млн):  $\delta = 10,53$  (s, 1H), 8,82 (t, J = 5,7 Гц, 1H), 8,51 (br.s, 1H), 7,89 (d, J = 8,0 Гц, 2H), 7,70 (d, J = 8,6 Гц, 1H), 7,56 (m, 3H), 7,06 (m, 2H), 6,37 (s, 1H), 6,24 (d, J = 2,5 Гц, 1H), 6,21 (s, 1H), 3,50 (s, 2H), 4,35 (d, J = 5,7 Гц, 2H), 3,99 (d, J = 5,0 Гц, 2H), 2,38 (s, 3H).

5 ПРИМЕР 5:

Синтез [2-оксо-2-(2-тиенилметилкарбамоиламино)этил] 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензоата

Смесь 310 мг (1,0 ммоль) 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]-уксусной кислоты, 250 мг (1,05 ммоль) 2-хлор-N-(2-тиенилметилкарбамоил)ацетамида, 75 мг (0,5 ммоль) NaI и 155 мг (1,2 ммоль) DPEA растворяли в 6 мл ДМСО. Полученную взвесь перемешивали в течение 72 часов при комнатной температуре до завершения реакции; превращение контролировали с помощью ЖХ-МС спектров. После этого реакционную смесь вливали в 50 мл воды, образованный осадок фильтровали и промывали с 15 дополнительной порцией воды, изопропилового спирта и гексана последовательно. Продукт высушивали в вакуумных условиях. Выход 61% (310 мг) [2-оксо-2-(2-тиенилметилкарбамоил-амино)этил] 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензоата.

ВЭЖХ-МС (Положительный режим): m/z 507/508 (M+H)<sup>+</sup>; Время удерживания 1,399 мин.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $\text{d}_6$ , част. на млн):  $\delta = 10,67$  (br s, 1H), 8,47 (br s, 1H), 8,03 (d, J = 8,0, 2H), 7,71 (d, J = 8,0, 1H), 7,64 (d, J = 8,0, 2H), 7,39 (d, J = 4,0, 1H), 7,08-6,95 (m, 4H), 6,22 (s, 1H), 5,35 (s, 2H), 4,92 (s, 2H), 4,52 (d, J = 4,6, 2H), 2,39 (s, 3H).

25 ПРИМЕР 6:

4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]-N-[2-оксо-2-(2-тиенилметилкарбамоиламино)этил]бензамид

Указанное в заглавии соединение приготавливали аналогично Примеру 3. Получали 90 мг указанного в заглавии соединения. Выход: 30%.

30  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $\text{D}_6$ , част. на млн):  $\delta = 10,52$  (s, 1H), 8,82 (t, J = 5,7 Гц, 1H), 8,63 (br.s, 1H), 7,89 (d, J = 8,0 Гц, 2H), 7,68 (d, J = 8,7 Гц, 1H), 7,55 (d, J = 8,0 Гц, 2H), 7,39 (d, J = 4,2 Гц, 1H), 7,07 (m, 2H), 6,98 (s, 1H), 6,95 (m, 1H), 6,21 (s, 1H), 5,31 (s, 2H), 4,23 (d, J = 5,2 Гц, 2H), 4,00 (d, J = 5,7 Гц, 2H), 2,39 (s, 3H).

## ПРИМЕР 7

Синтез [2-оксо-2-(2-пиридилметилкарбамоиламино)этил] 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензоата (MyoMed-203)

*Приготовление 2-хлор-N-(2-пиридилметилкарбамоил)ацетамида:*

5 К перемешиваемому раствору 2-пиридилметанамина (7,84 г, 72,5 ммоль) в безводном дихлорметане (100 мл), охлажденном до  $-10^{\circ}\text{C}$ , добавляли хлорацетил изоцианат (8,66 г, 72,5 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при к.т. Осажденное твердое вещество собирали путем фильтрации, промывали дихлорметаном ( $2 \times 30$  мл), и высушивали, получая 12,0 г (52,7 ммоль, выход: 10 73%) 2-хлор-N-(2-пиридилметилкарбамоил)ацетамида.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, Хлорформ-*d*):  $\delta = 9,45$  (s, 1H), 9,05 (s, 1H), 8,59 (s, 1H), 7,67 (t,  $J = 7,1$  Гц, 1H), 7,28 (d,  $J = 8,0$  Гц, 1H), 7,24 – 7,18 (m, 1H), 4,65 (d,  $J = 5,2$  Гц, 2H), 4,13 (s, 2H).

15 ВЭЖХ-МС (Отрицательный режим)  $m/z$  226 (M-H) $^+$ ; Время удерживания 0,565 мин.

*Приготовление 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензойной кислоты:*

20 К раствору 7-гидрокси-4-метил-хромен-2-она (80,6 г, 458 ммоль) в ацетоне (1000 мл)  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (94,9 г, 687 ммоль) и добавляли метил 4-(бромметил)бензоат (110 г, 480 ммоль) и реакционную смесь нагревали в колбе с обратным холодильником в течение 3 ч. После этого ее охлаждали до к.т. и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении и осадок смешивали с водой (1000 мл). Нерастворимое твердое вещество собирали путем фильтрации, промывали водой, 2-пропанолом, и гексаном, высушивали, и растворяли в 25 ДМСО (500 мл). 20% водного КОН (150 мл) добавляли к полученному раствору метил 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензоата и смесь оставляли перемешиваться в течение ночи при к.т. После завершения реакции, ее вливали в воду (3000 мл) и подкисляли до pH 1-2 с помощью 10% соляной кислоты. После перемешивания в течение 30 мин, осажденное твердое вещество собирали путем 30 фильтрации, промывали водой, 2-пропанолом, и гексаном, и высушивали, получая 106 г (342 ммоль, выход: 75%) 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензойной кислоты.

Метил 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензоат:

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 7,98$  (d,  $J = 8,1$  Гц, 2H), 7,68 (d,  $J = 8,5$  Гц, 1H), 7,60 (d,  $J = 8,1$  Гц, 2H), 7,12 – 6,96 (m, 2H), 6,20 (s, 1H), 5,32 (s, 2H), 3,85 (s, 3H), 2,38 (s, 3H).

5 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензойная кислота:

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 12,99$  (br s, 1H), 7,96 (d,  $J = 7,2$  Гц, 2H), 7,67 (d,  $J = 8,4$  Гц, 1H), 7,57 (d,  $J = 7,2$  Гц, 2H), 7,11 – 6,99 (m, 2H), 6,20 (s, 1H), 5,31 (s, 2H), 2,37 (s, 3H).

10 ВЭЖХ-МС (Положительный режим)  $m/z$  311 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ ; Время удерживания 1,242 мин.

*Приготовление [2-оксо-2-(2-пиридилметилкарбамоиламино)этил] 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензоата:*

15 Смесь 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензойной кислоты (9,28 г, 29,9 ммоль), 2-хлор-N-(2-пиридилметилкарбамоил)ацетамида (7,49 г, 32,9 ммоль), DIPEA (4,64 г, 35,9 ммоль), и NaI (0,900 г, 6,00 ммоль) в ДМСО (100 мл) перемешивали в течение ночи при к.т. и затем вливали в холодную воду (500 мл). Осажденное твердое вещество собирали путем фильтрации, промывали водой, 2-пропанолом, и гексаном, и высушивали, получая 13,8 г (27,5 ммоль, выход: 92%) [2-оксо-2-(2-пиридилметилкарбамоил-амино)этил] 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензоата (MyoMed-203).

20  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 10,65$  (br s, 1H), 8,69 (br s, 1H), 8,47 (d,  $J = 4,6$  Гц, 1H), 8,01 (d,  $J = 8,1$  Гц, 2H), 7,73 (t,  $J = 8,4$  Гц, 1H), 7,67 (d,  $J = 8,7$  Гц, 1H), 7,61 (d,  $J = 8,1$  Гц, 2H), 7,28 (d,  $J = 7,7$  Гц, 1H), 7,26 – 7,20 (m, 1H), 7,08 – 6,97 (m, 2H), 6,19 (s, 1H), 5,33 (s, 2H), 4,91 (s, 2H), 4,46 (d,  $J = 5,3$  Гц, 2H), 2,36 (s, 3H).

25 ВЭЖХ-МС (Отрицательный режим)  $m/z$  502 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^+$ ; Время удерживания 1,176 мин.

#### ПРИМЕР 8

30 Синтез 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]-N-[2-(2-тиенилметилкарбамоиламино)этил]бензамида (MyoMed-205)

*Приготовление трет-бутил N-[2-(2-тиенилметилкарбамоиламино)этил]карбамата:*

К суспензии CDI (42,8 г, 264 ммоль) в безводном ацетонитриле (400 мл) добавляли 2-тиенилметанамин (14,9 г, 132 ммоль) и реакционную смесь

поддерживали в ультразвуковой бане в течение 1 ч при к.т. После этого, добавляли воду (2,5 мл) и смесь поддерживали в ультразвуковой бане дополнительно в течение 30 мин. После дегазирования раствора, добавляли *N*-вос-этилендиамин (21,1 г, 132 ммоль) и реакцию перемешивали в течение 2 ч при 50°C. После этого смесь охлаждали до к.т. и упаривали при пониженном давлении. Осадок растирали в порошок с водой (100 мл), фильтровали, и высушивали, получая 35,2 г (118 ммоль, 89%) *трет*-бутил *N*-[2-(2-тиенилметилкарбамоиламино)-этил]карбамата.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = 7,35 (d, *J* = 5,8 Гц, 1H), 6,97 – 6,88 (m, 2H), 6,83 – 6,72 (m, 1H), 6,55 – 6,38 (m, 1H), 6,07 – 5,93 (m, 1H), 4,34 (d, *J* = 5,9 Гц, 2H), 3,11 – 3,00 (m, 2H), 2,99 – 2,88 (m, 2H), 1,37 (s, 9H).

ВЭЖХ-МС (Положительный режим) *m/z* 300 (M+H)<sup>+</sup>; Время удерживания 1,156 мин.

*Приготовление хлорида 2-(2-тиенилметилкарбамоиламино)этиламмония:*

К раствору *трет*-бутил *N*-[2-(2-тиенилметилкарбамоиламино)-этил]карбамата (19,5 г, 65,1 ммоль) в безводном дихлорметане (200 мл) добавляли 10% диоксан/HCl (50 мл) и реакционную массу перемешивали в течение 2 ч при к.т. Осажденное твердое вещество собирали путем фильтрации и высушивали в вакууме, получая 14,3 г (60,6 ммоль, 95%) хлорида 2-(2-тиенилметилкарбамоиламино)этиламмония.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = 8,08 (br s, 3H), 7,35 (s, 1H), 6,93 (s, 2H), 6,78 (br s, 1H), 6,51 (br s, 1H), 4,38 – 4,29 (m, 2H), 3,31 – 3,19 (m, 2H), 2,88 – 2,74 (m, 2H).

ВЭЖХ-МС (Положительный режим) *m/z* 200 (M+H)<sup>+</sup>; Время удерживания 0,428 мин.

*Приготовление 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензойной кислоты:*

К раствору 7-гидрокси-4-метил-хромен-2-она (80,6 г, 458 ммоль) в ацетоне (1000 мл) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (94,9 г, 687 ммоль) и добавляли метил 4-(бромметил)бензоат (110 г, 480 ммоль) и реакционную смесь нагревали в колбе с обратным холодильником в течение 3 ч. После этого ее охлаждали до к.т. и фильтровали. Фильтрат упаривали при пониженном давлении и осадок смешивали с водой (1000 мл). Нерастворимое твердое вещество собирали путем фильтрации, промывали водой, 2-пропанолом, и гексаном, высушивали, и растворяли в



ДМСО (500 мл). 20% водного КОН (150 мл) добавляли к полученному раствору метил 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензоата и смесь оставляли перемешиваться в течение ночи при к.т. После завершения реакции, ее вливали в воду (3000 мл) и подкисляли до pH 1-2 с помощью 10% соляной кислоты. После перемешивания в течение 30 мин, осажденное твердое вещество собирали путем фильтрации, промывали водой, 2-пропанолом, и гексаном, и высушивали, получая 106 г (342 ммоль, выход: 75%) 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензойной кислоты.

Метил 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензоат:

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 7,98$  (d,  $J = 8,1$  Гц, 2H), 7,68 (d,  $J = 8,5$  Гц, 1H), 7,60 (d,  $J = 8,1$  Гц, 2H), 7,12 – 6,96 (m, 2H), 6,20 (s, 1H), 5,32 (s, 2H), 3,85 (s, 3H), 2,38 (s, 3H).

4-[(4-Метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензойная кислота:

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 12,99$  (br s, 1H), 7,96 (d,  $J = 7,2$  Гц, 2H), 7,67 (d,  $J = 8,4$  Гц, 1H), 7,57 (d,  $J = 7,2$  Гц, 2H), 7,11 – 6,99 (m, 2H), 6,20 (s, 1H), 5,31 (s, 2H), 2,37 (s, 3H).

ВЭЖХ-МС (Положительный режим)  $m/z$  311 (M+H) $^+$ ; Время удерживания 1,242 мин.

*Приготовление 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]-N-[2-(2-тиенил-метилкарбамоиламино)этил]бензамида:*

К раствору 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензойной кислоты (12,6 г, 40,6 ммоль) в DMA (150 мл) CDI (7,26 г, 44,8 ммоль) добавляли и смесь перемешивали в течение 30 минут при к.т. После этого, добавляли хлорид 2-(2-тиенилметилкарбамоиламино)-этиламмония (10,1 г, 42,7 ммоль) и триэтиламин (4,90 г, 48,4 ммоль) и реакционную массу перемешивали при 50°C в течение 16 ч. После охлаждения смеси до к.т, добавляли воду (600 мл). Осажденное твердое вещество собирали путем фильтрации, промывали водой, 2-пропанолом, и гексаном, и высушивали, получая 13,3 г (27,1 ммоль, 67%) 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]-N-[2-(2-тиенил-метилкарбамоиламино)этил]бензамида (MyoMed-205).

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 8,61 - 8,47$  (m, 1H), 7,86 (d,  $J = 7,9$  Гц, 2H), 7,70 (d,  $J = 8,7$  Гц, 1H), 7,55 (d,  $J = 7,9$  Гц, 2H), 7,38 – 7,27 (m, 1H), 7,12 – 7,02 (m, 2H), 6,51 (t,  $J = 6,0$  Гц, 1H), 6,22 (s, 1H), 6,17 – 6,06 (m, 1H), 5,30 (s, 2H), 4,36 (d,  $J = 5,9$  Гц, 2H), 3,32 – 3,17 (m, 4H), 2,39 (s, 3H).

ВЭЖХ-МС (Положительный режим)  $m/z$  492 (M+H)<sup>+</sup>; Время удерживания 1,249 мин.

## II. Биохимический анализ

### 1. Исследование взаимодействия MuRF1 – титин:

5 Осуществляли скрининг низкомолекулярных молекул, используя ALPHA скрининг, для идентификации соединений, которые ингибируют взаимодействие между MuRF1 и титином. Скрининг основан на исследованиях взаимодействий MuRF1 и титина, которые идентифицировали MuRF1 В-бок-спиральный домен, который взаимодействует с титином A169 (см., например, Mrosek и др.,  
10 *Biochemistry* 2008, 47, 10722-10730). Прототип этого ALPHA скрининга описан в WO 2009/077618.

#### *Процедура:*

Эти взаимодействующие фрагменты экспрессируются в виде GST и биотин слитых белков, таким образом образование комплекса можно наблюдать с помощью  
15 акцептора глутатиона и авидиновых донорных шариков, соответственно, как описано на WO 2009/077618. Оценивали 280000 соединений (внутренняя библиотека, EMBL химическая центральная лаборатория), при этом было идентифицировано в целом 40 молекул с значениями  $K_i$  5-25 мкмоль/л для взаимодействия MuRF1-титин.

### 2. Определение ингибирования активности MuRF1 E3 лигазы:

После этого соединения оценивали для определения влияния на активность MuRF1 E3 лигазы, направленной на титин или на сам MuRF1 (само-убиквитинирование) путем смешивания 75 нмоль/л UBE1 (Boston Biochem), 1 мкмоль/л UbcH5c (Boston Biochem), 100 мкмоль/л Убиквитина, 4 ммоль/л АТФ,  
25 100 нмоль/л Титина A168-170 с 20-100 мкмоль/л соответствующих соединений. Реакции начинали путем добавления 220 нмоль/л MuRF1, после этого с помощью 1 ч при 37°C, SDS PAGE и Вестерн-блоттинг анализа с MuRF1 и титин-специфическими антителами. Все реакции также включали 5% ДМСО. Тестировали MyoMed-946, MyoMed-946-5, и MyoMed-946-8 и может быть  
30 идентифицировано, что они существенно ингибируют активность MuRF1 E3 лигазы, на основании характерных схем убиквитинирования.

3. Дифференциальная сканирующая флуориметрия (DSF) MuRF1 центрального фрагмента при отсутствии и в присутствии соединения MyoMed-946:

5 Влияние соединения MyoMed-946 на стабильность белка MuRF1 определяли с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF) в условиях *in vitro*.

*Метод:*

10 "MuRF1 центральный фрагмент" экспрессировали, как было описано ранее (Mrosek M и др., FASEB J, 2007, 21, 1383-1392) и использовали в DSF экспериментах при конечной концентрации 75 мкМ. Соединение MyoMed-946 разводили из 10 мМ маточного раствора в ДМСО до 100 мкМ в PBS в качестве буфера для DSF анализа, что приводило к конечной концентрации 1% ДМСО. После предварительного инкубирования в течение 1 часа при комнатной температуре, водные белковые растворы всасывали в капилляры и помещали на 15 Prometheus NT.48 nanoDSF устройство (NanoTemper Technologies, Munich, Germany). Изменения флуоресценции собственного триптофана или тирозина, что происходило после LED лазерного возбуждения при разворачивании белка в градиенте температуры, обнаруживали при 330 нм и 350 нм, соответственно. За 20 изменениями флуоресценции собственного белка в градиенте температуры наблюдали при 350 нм и 330 нм, соответственно. Первое производное длины волны флуоресценции при соотношении 350/330 нм при термическом разворачивании белка использовали для расчета точки перехода ( $T_m$ ) единственного и многократных переходных состояний.

*Результаты:*

25 Как можно увидеть на Фигуре 55,  $T_m$  для MuRF1 центрального фрагмента в PBS составляла 65,2 °С (жирная линия) и только пренебрежимо мало изменялась до 65,8°С путем добавления 1% ДМСО (пунктирная линия). В отличие от этого, сильное влияние на температурное разворачивание MuRF1 наблюдали путем добавления соединения MyoMed-946 (точечная линия). Соединение MyoMed-946 30 дестабилизировало MuRF1, на что указывает существенное уменьшение основанного  $T_m$  для 52,5 °С.

### III. Биологические исследования

#### 1. Эксперименты на клеточных культурах

Мышиные C2C12 миобласты (CRL-1772, ATCC) культивировали в DMEM (Lonza; Basel, Switzerland), дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой (FCS; Gibco®Invitrogen, Carlsbad, CA). Для индукции дифференциации в мышечные трубочки, субконфлюэнтные культуры переключали на DMEM, содержащую 2% лошадиную сыворотку (Sigma-Aldrich; Seelze, Germany). Мышечные трубочки последовательно предварительно обрабатывали в течение 2 ч с возрастающими концентрациями соединений (от 0,1 до 10 мкмоль/л, растворенных в ДМСО) или с равным объемом ДМСО перед обработкой в течение 24 ч с 10 мкмоль/л дексаметазона (DEX; Sigma-Aldrich; Seelze, Germany). После этого оценивали диаметр мышечных трубочек с помощью программного обеспечения для анализа изображения (Analysis 3.0, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany). Для определения цитотоксичности выбранных соединений, миобласты или мышечные трубочки инкубировали с возрастающими концентрациями в течение 24 ч. После этого, концентрацию активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) количественно определяли в супернатанте клеточной культуры как показатель разрушения клеток, как описано на Belloci и др., *Anal Biochem*, 2008, 374, 48-55. Как можно увидеть из Фигур 1 и 2, соединение MyoMed-946 проявляет низкую токсичность, как в миобластах, так и мышечных трубочках (миоцитах).

#### 2. Эксперименты на животных

##### *2.1 Модель легочной гипертензии у мышей:*

##### *2.1.1 Серии тестов 1 с MuRF1 ингибитором MyoMed-946:*

Эксперименты на животных получили разрешение Regierungspräsidium Karlsruhe (35-9185,81/G-141/13) и Regierungspräsidium Leipzig (TVV 40/16). В это исследование было включено три группы мышей, включая: 1) обработанные солевым раствором (ложн.; n=20); 2) обработанные монокроталином (МСТ), которые получали нормальный корм (МСТ; n=27); и 3) обработанные МСТ, которые получали питание кормом с MuRF1 ингибитором (МСТ+соединение; n=27). Вкратце, C57BL/6 мышам (возраст 8 недель) подкожно инъецировали раз в неделю либо МСТ (600 мг/кг) или соответствующий объем физиологического раствора в течение 6 недель, периода времени, в течение которого МСТ, как известно, индуцирует сердечную кахексию вследствие легочной гипертензии и

последующую дисфункцию правого желудочка, а не анорексию, как описано Ahn и др., *PLoS One*, 2013, 8:e62702. Мышей подвергали воздействию идентичных состояний при цикле 12:12 ч день/ночь с питанием и доступом до воды, которые обеспечивали *ad libitum*. Группа МСТ+соединение начинала  
5 получать корм с ингибитором за 1 неделю до инъекций МСТ, в то время как ложн. и МСТ группы получали питание идентичным кормом, но без добавления выбранного соединения. Вес тела записывали каждую неделю для каждой мыши. Мышей умерщвляли после глубокой анестезии путем в/б введения фентанила (0,05 мг/кг), медетомидина (0,5 мг/кг), мидазолама (5 мг/кг) и кетамина (100  
10 мг/кг). После умерщвления, сердце и легкие иссекали, очищали, промокали насухо и взвешивали, сердце фиксировали в 4 % PBS-забуференном формалине. Левую переднюю большеберцовую мышцу (ТА), камбаловидную мышцу, длинный разгибатель пальцев (EDL), и срезы реберной диафрагмы также иссекали, взвешивали и фиксировали в 4% PBS забуференном формалине, тогда  
15 как оставшиеся части мышц сразу замораживали в жидком N<sub>2</sub> для молекулярного анализа.

Для гистологической оценки, заделанные в парафин ТА срезы мышц (3 мкм) окрашивали с помощью Н&Е и площадь поперечного сечения волокон (CSA) и затем оценивали с помощью визуализирующего программного  
20 обеспечения (Analysis 3.0, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany). Дополнительно, медиальные поперечные сечения (3 мкм) сердца устанавливали на предметные стекла и затем окрашивали с помощью Н&Е для оценки толщины стенки RV.

Как можно увидеть из Фигур 3 - 5, прирост массы, вес легких и вес сердца были  
25 практически идентичными для мышей, получавших питание с МСТ и МСТ+МуоMed-946, что подтверждает факт прогрессирования заболевания в обеих группах, независимо от соединений, вводимых с кормом. Является важным, как можно увидеть из Фигур 6 и 7, что *MuRF1 ингибитор* МуоMed-946 ослабляет развитие гипертрофии правого желудочка. Кроме того, как можно  
30 увидеть из Фигур 8 - 12, в то время как мыши, леченные МСТ, демонстрируют прогрессирующую потерю массы скелетных мышц, то мыши, получавших питание МСТ + соединение, не придерживаются этой тенденции и были защищены - наиболее очевидный эффект наблюдается в ТА мышце.

2.1.2 Серии тестов 2 с MuRF1 ингибиторами MyoMed-946, MyoMed-203 и MyoMed-205:

Серии тестов 2 осуществляли аналогично сериям тестов 1. Вкратце, в это исследование было включено три группы мышей: 1) обработанный солевым раствором мыши (ложн.; n=10);

2) мыши, обработанные монокроталином (МСТ), получавших питание нормальным кормом (МСТ; n=10); и

3) мыши, обработанные МСТ, получавших питание с кормом с MuRF1 ингибитором (МСТ+соединение; n=10 для каждого соединения). C57BL/6 мышам в возрасте 8 недель подкожно инъецировали раз в неделю либо МСТ (600 мг/кг) или соответствующий объем физиологического раствора в течение 8 недель. Группа МСТ+соединение начинала получать корм с ингибитором за 1 неделю до инъекций МСТ, в то время как ложн. и МСТ группы получали питание идентичным кормом, но без добавления выбранного соединения. Концентрация соединения в корме составляла 0,1 мас.%, что приводило к суточному поглощению соединения на мышь приблизительно 3 мг. Вес тела записывали каждую неделю для каждой мыши. Мышей умертвляли после лечения в течение 8 недель. После умерщвления, осуществляли исследование и анализ тканей, как описано на серии тестов 1.

Как можно увидеть из Фигур 13 - 15, прирост массы, вес легких и вес сердца были сходными между мышами, получавших питание МСТ и МСТ + соединение, что подтверждает факт прогрессирования заболевания в обеих группах, независимо от соединений, вводимых с кормом. Также в этой серии тестов, как можно увидеть из Фигур 16 - 18, MuRF1 ингибиторы MyoMed-946, MyoMed-203 и MyoMed-205 ослабляют развитие гипертрофии правого желудочка. Кроме того, как можно увидеть из Фигур 19 - 21, в то время как мыши, леченные МСТ, демонстрируют прогрессирующую потерю массы скелетных мышц, мыши, получавшие питание МСТ + соединение, не придерживаются этой тенденции и были защищены – наиболее заметный эффект, наблюдаемый для соединения MyoMed-203. Кроме того, уровень MuRF1-экспрессия в ткани ТА мышцы был заметно уменьшен у мышей, получавших питание МСТ + соединение, где наиболее заметный эффект наблюдался для соединения MyoMed-205, как можно увидеть из Фигуры 22. Также уровень экспрессии телетонина, MuRF1 целевого белка, был существенно

нормализован у мышей, получавших питание МСТ + соединение, как можно увидеть из Фигуры 23.

## 2.2 Модель инфаркта миокарда LAD у мышей:

5 Модель инфаркта миокарда у мышей, страдающих от сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса (HFrEF), создавали путем лигирования левой передней правой коронарной артерии (LAD), как описано ниже, для индуцирования острого инфаркта миокарда (MI), с последующим развитием хронической (систолической) сердечной недостаточности (CHF).

### Процедура LAD лигирования:

10 Хирургическое вмешательство для мелких животных осуществляли на C57/BL6 мышам в возрасте 12 недель в Leipzig Heart Center в соответствии с установленными и хорошо известными процедурами в данной области техники (см., например, Bowen и др., *J Appl Physiol*, 2015, 118, 11–19; Mangner и др., *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2015, 6, 381–390). Вкратце, мышам из LAD группы  
 15 анестезировали путем в/б инъекции MMF; Медетомидина (0,5 мг/кг вес тела), Мидазолама (5,0 мг/кг вес тела), Фентанила (0,05 мг/кг вес тела). Бессознательных мышам фиксировали на операционном столе. Вентральные отделы грудной клетки выбривали, промывали и стерилизовали. Затем бессознательных мышам интубировали и вентилировали обычным комнатным  
 20 воздухом с использованием респиратора для животных (TSE GmbH, Siemensstr. 21, 61352 Bad Homburg; продукт: [http://tinateb.com/wp-content/uploads/2016/06/TSE\\_Respirator-Compact\\_20080724\\_HR.pdf](http://tinateb.com/wp-content/uploads/2016/06/TSE_Respirator-Compact_20080724_HR.pdf)). Для LAD операции, грудную клетку открывали от приблизительно 1 см выше мечевидного отростка до приблизительно 1 см слева парастернально, рассекая кожу в этом  
 25 месте. Расположенную ниже грудную мышцу перемещали в стороны без дальнейшего повреждения для доступа к стенке грудной клетки. Межреберные мышцы между двумя ребрами отводили в сторону без перелома ребер. Созданный таким образом внутригрудной доступ расширяли хирургическим расширителем, введенным над перикардом. Перикард вскрывали культей  
 30 хирургическим путем с помощью двух анатомических щипцов. Вилочковую железу, если она присутствует в операционном поле, отодвигали в сторону хирургическим тампоном, чтобы получить доступ к корню аорты. Сердце аккуратно выводили из перикарда с помощью крючка, а левое предсердие отводили в сторону хирургическим тампоном. После этого LAD лигировали с

помощью 5,0 шовного материала пролен (Ethicon, см. <http://www.ethicon.com/healthcare-professionals/products/wound-closure/non-absorbable-sutures/prolene-polypropylene>). Лигирование осуществляли близко к корню аорты, шов затягивали до появления бледности передней стенки коронарной артерии. После лигирования, стенку грудной клетки и затем кожу закрывали однорядным пуговичным швом, используя 4.0 шовный материал пролен (компания: Ethicon).

В качестве контроля, осуществляли ложные операции. Для ложной контрольной группы, процедура была по сути аналогичной описанной выше, за исключением того, что 5.0 шовный материал пролен был только свободно наложен вокруг LAD без затягивания.

Операцию заканчивали экстубацией и антагонизацией анестезии путем в/б инъекции Атипамезола (2,5 мг/кг вес тела) и Флумазенила (0,5 мг/кг вес тела). Мышей усаживали на согревающий мат до пробуждения, а затем пересаживали обратно в клетки для животных. Время для всей описанной выше процедуры для экспертного персонала составляло около 30 мин.

Через одну неделю после LAD лигирования, осуществляли эхокардиографию в М-режиме для подтверждения МИ, то есть конечно-диастолический диаметр левого желудочка (LVEDD) и систолический (LVESD) диаметр оценивали для возможности расчета левожелудочковой (LV) фракции укорочения (LVFS =  $[LVEDD - LVESD] / LVEDD \times 100$ ). Только мыши с большим инфарктом (фракция выброса левого желудочка (LVEF) <20%) были последовательно рандомизированы на две группы, то есть одна группа получала нормальное питание (CHF,  $n = 11$ ), а вторая группа получала питание, дополненное соединением (0,1% соединения MyoMed-946, CHF + MyoMed-946,  $n = 12$ ). Ложно оперированные животные получали только нормальное питание ( $n=15$ ). Через девять недель, снова осуществляли эхокардиографию.

Таблица 1: Характеристики животных через 10 недель после вмешательства

	Ложн. (n=15)	CHF (n=11)	CHF + MyoMed-946 (n=12)
<i>Физические</i>			
Вес тела (г)	22,6 ± 0,5	22,4 ± 0,6	23,8 ± 0,4
Вес сердца к телу (г/мг)	5,03 ± 0,11	7,87 ± 0,55***	7,52 ± 0,57***
Вес легких (влажн./сух.)	4,16 ± 0,07	4,48 ± 0,06*	4,47 ± 0,10*
<i>Гистология</i>			



	Ложн. (n=15)	CHF (n=11)	CHF + MyoMed-946 (n=12)
Размер инфаркта LV (%)	—	30,5 ± 4,6	27,1 ± 2,9
<i>Эхокардиография</i>			
LVEDD (мм)	3,8 ± 0,1	6,2 ± 0,2***	5,9 ± 0,2***
LVESD (мм)	2,6 ± 0,1	5,8 ± 0,3***	5,3 ± 0,2***
LVEF (%)	59,6 ± 2,7	16,1 ± 2,9***	21,1 ± 2,5***
LVFS (%)	31,8 ± 1,9	7,5 ± 1,4***	9,9 ± 1,2***

\* $P < 0,05$  отн. ложн.; \*\*\* $P < 0,001$  отн. ложн.

Животных умерщвляли для сбора тканей, в особенности ткани диафрагмы, для функциональных и молекулярных характеристик. Все эксперименты и процедуры были разрешены местным Советом по исследованиям на животных, University of Leipzig, и Landesbehörde Sachsen (TVV 36/15).

### 2.3 Сократительная функция:

Для обеспечения непосредственной функциональной оценки, измеряли сократительную способность в пучках волокон скелетных мышц, то есть пучок волокон из диафрагмы МСТ мышей и CHF мышей, как описано ниже. Пучок волокон из диафрагмы выделяли для предоставления возможности измерения сократительной функции в условиях *in vitro*, используя рычажную систему с регулируемой длиной (301B, Aurora Scientific Inc., Aurora, Canada), как описано Bowen и др., *FASEB J*, 2017, 31. Вкратце, мышечный пучок устанавливали вертикально в заполненную буфером баню для органа (~22°C), устанавливали на оптимальную длину, и через 15 мин стимулировали согласно протоколу сила-частота в диапазоне 1-300 Гц (600 мА; продолжительность цепи 500 мс; ширина импульса 0,25 мс). После этого мышцу подвергали протоколу сила-скорость, где мышце предоставляли возможность укорачиваться относительно внешних нагрузок (80 - 10 % максимальной судорожной силы; каждая разделенная 1 мин) после стимуляции при 150 Гц в течение 300 мс. Скорость укорочения определяли через 10 мс после первого изменения длины и на линейном участке переходного процесса (DMA программное обеспечение, Aurora Scientific). Силу (N) нормировали к площади поперечного сечения мышцы (CSA; см<sup>2</sup>) путем деления массы мышцы (г) на продукт L<sub>0</sub> (см) и расчетную плотность мышц (1,06), что дает возможность рассчитать удельную силу в Н/см<sup>2</sup>. Скорость укорочения нормировали к оптимальной длине мышцы (в L<sub>0</sub>/с), в то время как

рассчитывали мощность для каждой нагрузки в виде результата скорости укорочения и удельной силы (в Вт/см<sup>2</sup>).

Как можно увидеть из Фигур 24 - 27, пучки мышечных волокон диафрагмы от мышей с хронической сердечной недостаточностью (CHF мыши) развивали меньше силы при электрической стимуляции (Фигура 24), и также имели уменьшенную максимальную силу (Фигуры 25 и 26) и пиковую мощность (Фигура 27). Следовательно, по сравнению с ложными животными, мыши с CHF на контрольном корме развивали миопатию диафрагмы в неделю 10. Питание с применением соединения MyoMed-946 защищало мышей от такой пост-инфарктной слабости диафрагмы. Потеря функции диафрагмы и максимальной силы диафрагмы вследствие хронической сердечной недостаточности может быть существенно уменьшена у мышей, которых кормили соединением MyoMed-946 по сравнению с нелеченной группой CHF мышей. Это указывает на то, что селективное ингибирование MuRF1 с помощью соединения MyoMed-946 опосредует благоприятное действие на функцию диафрагмы после сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса (HFrEF), индуцированную инфарктом миокарда.

Аналогично этому, как можно увидеть из Фигур 28 – 30, сократительные дисфункции диафрагмы (что касается скорости укорочения и мощности) у мышей, страдающих от МСТ-индуцированной легочной гипертензии, также существенно предотвращены, когда МСТ мышей кормили с применением соединения MyoMed-946 (МСТ + MyoMed-946).

Таким образом, в совокупности приведенные выше данные свидетельствуют о том, что селективное ингибирование MuRF1 с помощью соединения MyoMed-946 опосредует благоприятное действие как на количество скелетных мышц (то есть, массу), так и качество (то есть сократительную функцию) при хронической сердечной недостаточности и при сердечной кахексии.

#### *2.4 Модель опухоли у мышей:*

Самкам C57BL/6N мышей в возрасте 8 недель инокулировали B16F10 клетки меланомы ( $9 \times 10^5$  клеток) или солевой раствор (ложн., n = 10). В течение первых 3 дней после инокуляции опухоли, B16F10 мыши, также как и ложн. мыши, получали обычный корм. После этого B16F10 мышей случайным образом разделяли на три группы, где первая группа получала MyoMed-946 корм

(Опухоль + MyoMed-946, n = 10), вторая группа получала MyoMed-205 корм (Опухоль + MyoMed-205, n = 10) и третья группа получала идентичный корм, но без добавления выбранных соединений (Опухоль, n = 10). Концентрация соединения в корме составляла 0,1 мас.%, что приводило к суточному поглощению соединения на мышь приблизительно 3 мг. Также ложн. группу кормили идентичным кормом, но без добавления выбранного соединения. Тесты вытяжения на проволоке (мышечная функция) осуществляли с каждой мышью через 9, 16 и 23 дня после инокуляции опухоли. Для этого, использовали стандартную конструкцию проволочного подвеса с проволокой (длина: 40 см, диаметр: 2,5 мм) на высоте 70 см от пола. Под центр проволоки подкладывали большой ящик с опилками. Для тестирования мышь подвешивали к проводу за две конечности и записывали время подвешивания. У каждого животного было три попытки в течение 180 сек. максимум каждая. После трех попыток рассчитывали максимальный удерживающий импульс (время подвешивания x вес тела).

Мышей умертвляли через 25 дней после инокуляции опухоли. После умерщвления, осуществляли исследование и анализ ткани, как описано выше.

Как можно увидеть из Фигуры 31, опухоль индуцирует атрофию скелетных мышц (на основе веса TA мышцы) может быть ослаблена у мышей в группе опухоль + MyoMed-946 и мышей в группе опухоль + MyoMed-205 по меньшей мере до определенной степени по сравнению с мышами с опухолью. Этот эффект был более заметным в тесте вытяжения на проволоке (Фигура 32), где введение соединений MyoMed-946 и MyoMed-205 (мышам в группах опухоль + MyoMed-946 и мышам в группе опухоль + MyoMed-205) существенно ослабляет потерю мышечной функции по сравнению с мышами с опухолью на обычном питании.

### *2.5 Изменения сердечных и скелетных мышц при сердечной недостаточности с сохранённой фракцией выброса (HFpEF) – модель на крысах*

Схематическое изображение схемы исследования представлено на Фигуре 56. Для этого теста, использовали ZSF1 крыс. После достижения 20, ZSF1 крысы теряют диастолическую податливость, что приводит к увеличению конечно-диастолического объема и, следовательно, воспроизводят HFpEF человека (также известную как диастолическая сердечная недостаточность).

Самки ZSF1 тощих (контроль, n=25) и ZSF1 тучных (n=40) крыс включали в исследование. В возрасте 20 недель развитие HFpEF подтверждали с помощью эхокардиографии / инвазивных гемодинамических измерений, и собирали тканевую материал из поднабора животных (контроль n=10; ZSF1 тучные n=10).

5 Оставшиеся контрольные крысы (контроль, n=15) выдерживали в сидящем режиме в течение дополнительных 12 недель, в то время как оставшиеся ZSF1 тучные животные (n=30) рандомизировали на следующие группы: (1) крысы, получающие обычный корм (HFpEF группа, n = 15) или корм, дополненный соединением MyoMed-205 (0,1% MyoMed-205, HFpEF+MyoMed-205, n = 15).

10 Крыс подвергали воздействию идентичных условий в цикле 12 ч день/ночь, с доступом до еды и воды, обеспеченными ad libitum. Через двенадцать недель после рандомизации, осуществляли эхокардиографию и инвазивные гемодинамические измерения для уточнения степени диастолической дисфункции. После этого крыс умерщвляли (вскрытие грудной клетки при

15 глубокой анестезии), и собирали скелетные мышцы и ткань миокарда для функциональных и молекулярных анализов (фиксация в формалине и мгновенное замораживание в жидком азоте). Все эксперименты и процедуры были разрешены местным Советом по исследованиям на животных, TU Dresden и Landesbehörde Sachsen (TVV 42/2018).

20 Эхокардиография

Крыс анестезировали с применением изофлурана (1,5-2%) и осуществляли трансторакальную эхокардиографию, используя Vevo 3100 систему и 21-МГц преобразователь (Visual Sonic, Fujifilm) для оценки сердечной функции, как было описано ранее (T.S. Bowen и др., Eur. J. Heart Fail., 2015, 17, 263-272). Для

25 систолической функции, измеряли В- и М-Режим парастернальной длинной и короткой оси на уровне сосочковых мышц. Диастолическую функцию оценивали в апикальной 4-камерной проекции с использованием доплерографии пульсовой волны (или измерение ранней (E) и предсердной (A) волн скорости митрального клапана) и доплер тканей (для измерения скорости миокарда (E' и

30 A')) на уровне базального сегмента перегородки в стенке перегородки левого желудочка. Получали функциональные параметры (то есть фракция выброса LV (LVEF) и ударный объем (SV)) и соотношения [E/E'] и [E/A]), используя Vevo LAB 2.1.0 программное обеспечение.

### Инвазивные гемодинамические измерения

Осуществляли инвазивные измерения гемодинамического давления в качестве конечной процедуры. У анестезированных (кетамин, ксилазин), но спонтанно дышащих крыс была канюлирована правая сонная артерия с помощью Rat PV катетера (SPR-838, ADInstruments Limited), который осторожно помещали в  
5 середину левого желудочка. Измеряли конечно-диастолическое и конечно-систолическое давление LV, максимальную скорость повышения давления (dP/dtmax), максимальную скорость снижения давления (dP/dtmin), и постоянную времени ( $\tau$ ) для расслабления LV, после чего выводили катетер в  
10 аорту, измеряли фазовое и среднее артериальное давление. Среднее артериальное давление измеряли в восходящем отделе аорты. Данные записывали на программном обеспечении LabChart8 (ADInstruments).

### Функции скелетных мышц

Правую EDL и левую камбаловидную мышцу иссекали и устанавливали  
15 вертикально в заполненный буфером Krebs-Хенселейта баню для органа между крюком и датчиком силы, с непрерывной записью и оцифровкой выходного сигнала (1205A: Isolated Muscle System - Rat, Aurora Scientific Inc., Ontario, Canada). Мышечную функцию оценивали в условиях *in vitro* путем стимуляции  
20 мышцы платиновыми электродами со сверхмаксимальным током (700 мА, продолжительность цепи 500 мс, ширина импульса 0,25 мс) от высокомоощного биполярного стимулятора (701C; Aurora Scientific Inc., Ontario, Canada). Мышечный пучок устанавливали на оптимальную длину ( $L_0$ ), эквивалентную  
25 продуцируемой максимальной силе сокращения, после этого температуру бани повышали до 25°C и после этого осуществляли 15-минутный период уравнивания термоса. Затем осуществляли протокол сила-частота при 1, 15, 30, 50, 80 и 120 Гц, разделенный 1-минутными интервалами покоя. После 5-ти  
30 минутного периода покоя, затем мышцы подвергали протоколу утомляемости в течение 5 минут (40 Гц каждые 2 секунды). Силы, созданные при осуществлении протокола утомляемости, нормировали к созданной начальной силе для обеспечения относительной оценки утомляемости.

Результаты:Характеристики животных в период 20 недель (временная точка рандомизации)

Для верификации развития HFpEF перед рандомизацией животных на различные группы для лечения, 10 ZSF1-тощих и 10 ZSF1-тучных животных анализировали с помощью эхокардиография, инвазивных гемодинамических измерений и измерений функции скелетных мышц. ZSF1-тучные животные проявляли повешенный вес тела (признак ожирения), и были очевидными признаки гипертрофии миокарда (повышенный вес сердца при нормировании к длине большеберцовой кости). Что касается маркеров для диастолической функции, то соотношение  $E/\dot{e}$  и конечно-диастолическое давление левого желудочка (LVEDP) было существенно увеличенными у ZSF1-тучных животных. Несмотря на нарушенную диастолическую функцию, фракция выброса левого желудочка (LVEF) была нормальной (>60%) и даже немного более высокой по сравнению с тощими контрольными крысами. Что касается среднего артериального кровяного давления (МАВР), то наблюдали существенное увеличение у ZSF1-тучных животных. Это повышение МАВР является признаком гипертонического состояния у животных, характерным признаком, который хорошо известен для HFpEF пациентов. Что касается периферических скелетных мышц, то у ZSF1-тучных животных развивалась мышечная атрофия и нарушение функции скелетных мышц. Таким образом, у животных в возрасте 20 недель развивались характерные признаки, которые соответствовали диагнозу HFpEF.

Влияние лечения с применением MyoMed-205 на сердечные параметры при HFpEF

Для оценки влияния MyoMed-205 на функцию миокарда, осуществляли эхокардиографию и инвазивные гемодинамические измерения. Как показано на Фигуре 57, фракция выброса левого желудочка (LVEF) (Фиг. 57А) была существенно уменьшена у нелеченных HFpEF животных по сравнению с контрольными ZSF1-тощими животными. Это уменьшение существенно ослабляется путем 12-ти недельного лечения с применением MyoMed-205. Что касается параметров для диастолической функции, соотношения  $E/\dot{e}$  (Фиг. 57В) и LVEDP (Фиг. 57С), то лечение с применением MyoMed-205 ослабляет повышение, наблюдаемое у ZSF1-тучных нелеченных животных. Не наблюдали эффекта от лечения с применением MyoMed-205 на МАВР (Фиг. 57D). Взятые в

совокупности, эти результаты свидетельствуют о том, что лечение с применением MyoMed-205 существенно улучшает систолическую, а также диастолическую функцию и этот эффект не опосредуется модуляцией кровяного давления.

5 Влияние лечения с применением MyoMed-205 на массу и функцию скелетных мышц

10 Масса скелетных мышц и функции скелетных мышц уже была нарушена у ZSF1-тучных животных в момент времени для рандомизации на различные группы для лечения. В данном тесте исследовали, способен ли MyoMed-205 модулировать  
 15 массу и функцию скелетных мышц. Результаты можно найти на Фигуре 58. Анализ мышечного веса передней большеберцовой мышцы (ТА) (Фиг. 58А) обнаружил существенное снижение сырого веса мышцы у HFpEF нелеченных животных. Эта мышечная атрофия ослабляется с помощью MyoMed-205. Что касается EDL (Фиг. 58С) и камбаловидной мышцы (Фиг. 58В), то развитие  
 20 HFpEF не оказывает влияния на сырой вес мышцы. Тем не менее, у EDL мышце лечение с применением MyoMed-205 приводит к незначительному, но достоверному повышению веса мышцы (Фиг. 58С).

Кроме измерения веса мышцы для развития мышечной атрофии, чрезвычайно важно оценить мышечные функции. Как показано на Фиг. 58D, у ZSF1-тучных  
 25 животных, которые не подвергались лечению, развивалась дисфункция скелетных мышц по сравнению с ZSF1-тощей контрольной группы. Это падение мышечного усилия является очевидным в камбаловидной мышце (Фиг. 58D) при измерении абсолютного удельного мышечного усилия. Лечение HFpEF животных в течение 12 недель с применением MyoMed-205 приводило к  
 30 ослаблению потери функции.

Вывод:

Результаты свидетельствуют о том, что при HFpEF MyoMed-205 ослабляет развитие диастолической дисфункции миокарда и ослабляет атрофию скелетных мышц и дисфункцию скелетных мышц.

30 2.6 Индуцированная доксорубицином мышечная атрофия и кардиотоксичность

Доксорубицин (DOX) представляет собой эффективное химиотерапевтическое лекарственное средство, используемое для лечения различных злокачественных новообразований. Тем не менее, его применение связано с ранней и хронической кардиотоксичностью и миотоксичностью. У грызунов, однократная инъекция

Доксорубицина способна уменьшить массу сердечных и скелетных мышц, с последующим заметным нарушением функции.

Оценивали влияние обогащенного MyoMed-205 корма на модели у мышей, которых лечили с применением Доксорубицина. C57bl/6 мышей

5 акклиматизировали в виварии в течение трех дней, затем случайным образом сортировали на четыре группы, как описано ниже: 1. Контроль (плацебо корм + в/б инъекции 0,9% солевого раствора); 2. MyoMed-205 (MyoMed-205-корм, корм, дополненный 1 г/кг MyoMed-205; + инъекции 0,9% солевого раствора); 3. DOX (плацебо корм + DOX инъекции); 4. DOX+MyoMed-205 (MyoMed-205 корм +  
 10 DOX инъекции). Животных предварительно кормили с применением либо MyoMed-205 корма или плацебо в течение семи дней перед первой инъекцией DOX. Лечение DOX осуществили в суммарной дозе 25 мг/кг, вводимой в виде пяти инъекций в дни 10, 12, 16, 25 и 28, соответственно. Вес животных и поглощение пищи измеряли ежедневно в одно и то же время для оценки  
 15 потребления пищи и прироста массы. Сердечные функции оценивали в дни 19 и 42 с помощью эхокардиографии. Как показано на Фигуре 59, питание с использованием MyoMed-205 способно уменьшить характерные признаки кахексийного истощения и внутреннего напряжения заметно в день 43: мышцы, которых кормили MyoMed-205, имели более высокую массу нежировых тканей  
 20 (Фиг. 59А), сохраняли больше жировой ткани в организме (Фиг. 59В), и имели приблизительно в 2 раза меньше свободных жидкостей интерстициального отека (Фиг. 59С). \* обозначает  $p < 0,05$  отн. контроль; \$ обозначает  $p < 0,05$  отн. MyoMed-205; § обозначает  $p < 0,05$  отн. DOX+MyoMed-205 (Послеэкспериментальный тест с критерием Тьюки).

25 Эхокардиография в день -15 и после 25 мг/кг накопленной дозировки DOX указывала на кардиотоксичность и повреждение, как можно увидеть из Фигуры 60, то есть снижение веса сердца (скорректированное на длина большеберцовой кости) (Фиг. 60С), сниженная фракция выброса (рассчитанные на основании  
 30 схемы длинной оси) (Фиг. 60А), и уменьшенная фракция укорочения (рассчитанная на основании схемы короткой оси) (Фиг. 60В), соответственно. Лечение с применением MyoMed-205 до дня 43 предотвращает развитие этих нарушений. Такие образом, введение MyoMed-205 при DOX химиотерапии является полезным для защиты сердца. \* обозначает  $p < 0,05$  отн. контроль; \$



обозначает  $p < 0,05$  отн. MyoMed-205; § обозначает  $p < 0,05$  отн. DOX+MyoMed-205 (Послеэкспериментальный тест с критерием Тьюки).

2.7 *Мышечная функция у тучных мышей с диабетом 2 типа во время индуцированной диеты потери веса (DIO модель у мышей: диабет с резистентностью к инсулину и ожирением)*

5 Тестировали влияние питания с применением соединения на мышечной модели диабета, при котором также развивается миопатия при прогрессировании диабета. Диабет индуцировали питанием с высоким содержанием фруктозы и жира (HFD) в течение 4 месяцев у DIO мышей. Прирост массы тела составил 10 22,2%. У мышей развивалась повышенная концентрация глюкозы натощак и резистентность к инсулину. Контрольная группа животных получала нормальное питание для грызунов (регулярное питание). После этого потерю веса индуцировали в течение 30 дневного тестируемого периода. На первой стадии, животные получали нормальное питание для грызунов в течение 16 дней. После 15 этого, на второй стадии животные получали низкокалорийное питание в течение 14 дней. Вес тела снижался на 12,4% в среднем в конечной точке. Через два дня после начала первой стадии, питание дополняли MyoMed-205 (в дозе 1 г соединение /1 кг пищи). В начале первой стадии и затем в дни 3, 7, 14, 21 и 28 тестируемого периода, сравнивали мышечную силу с помощью тестов 20 и контрольных мышечных относительно их мышечной силы с помощью тестов вытяжения на проволоке.

*Схема исследования:* Самцы мышей ICR-DIO рандомизировали на группы по 8-10 животных каждая. Три контрольные группы включали: Контрольная группа мышей без ожирения (Контроль; регулярное питание (RD);  $n=10$ ), тучные мыши, 25 которые получали питание с высоким содержанием фруктозы и жиров в течение всего периода исследования (DIO HFD;  $n = 8$ ); и тучные мыши с изначальной потерей веса (DIO контроль;  $n = 8$ ).

*Тест вытяжения на проволоке:* Для теста вытяжения на проволоке (WHT), использовали стандартную конструкцию проволочного подвеса с проволокой 30 (длина: 40 см, диаметр: 2,5 мм) на высоте 70 см от пола. Под центр проволоки подкладывали большой ящик с опилками. Для тестирования, мышца подвешивали к проволоке двумя конечностями и записывали время, в течение которого мышца могла удержаться на проволоке, прежде чем упасть. У каждого животного было три попытки максимально в течение 180 секунд. После трех попыток,

рассчитывали максимальный удерживающий импульс (время подвешивания х вес тела).

*Результаты:*

Группы		Наблюдаемые эффекты на мышечную силу в Тесте вытяжения на проволоке (WHT)
1	Контроль (RD)	Нет эффекта на WHT, контрольная группа
2	DIO контроль	Снижение WHT результативности, по сравнению с группой 1
3	DIO HFD	Снижение WHT результативности, по сравнению с группами 1 и 2
5	MyoMed-205-леченные DIO	Существенное улучшение мышечной силы в WHT на неделю 4 по сравнению с группами 2 и 3

5 Фигура 61 представляет собой графическую иллюстрацию результатов WHT для MyoMed-205-леченных DIO мышей по сравнению с DIO контрольными мышами. Как можно увидеть, MyoMed-205 существенно улучшает мышечную силу по сравнению с DIO контрольными мышами на неделю 4 (28 дней). Мышечная сила также существенно улучшается по сравнению с DIO HFD мышами и  
10 существенно не отличается от контрольной группы (RD) мышей в неделю 4 (не показано на Фигуре 61).

*2.8 Регуляция глюкозы и инсулина у тучных мышей с диабетом 2 типа во время индуцированной диетой потери веса (DIO мышинная модель: диабет с резистентностью к инсулину и ожирением)*

15 Аналогично примеру 2,7, диабет индуцируется питанием с высоким содержанием фруктозы и жира (HFD) в течение 4 месяцев у DIO мышей. У мышей развивалась повышенная концентрация глюкозы натощак и резистентность к инсулину. Контрольная группа животных получала нормальное питание для грызунов (регулярное питание). После этого потерю веса  
20 индуцировали в течение 30 дневного тестируемого периода. На первой стадии, животные получали нормально питание для грызунов в течение 16 дней. После этого, на второй стадии животные получали низкокалорийное питание в течение 14 дней. Через два дня после начала первой стадии, питание дополняли MyoMed-203 (в дозе 1 г соединения /1 кг пищи).

25 *Схема исследования:* Самцов мышей ICR-DIO рандомизировали на группы по 8-10 животных каждая. Включали три контрольные группы: Контрольная группа мышей без ожирения (контроль; регулярное питание (RD); n=10), тучные мыши получали питание с высоким содержанием фруктозы и жира в течение всего

исследуемого периода (DIO HFD; n =8); и тучные мыши с изначальной потерей веса (DIO контроль; n = 8).

#### *Определение уровня глюкозы в крови*

5 Определение уровня глюкозы в крови осуществляли после 6-ти часового голодания. Использовали On Call Plus глюкометр (Acon Laboratories, Inc., USA) и специальные тест-полоски (REF G133-111) для определения уровней глюкозы. Кровь получали из хвостовой вены путем надсечения кончика хвоста. Для каждого анализа использовали 5-6 мкл крови.

10 У MyoMed-203-леченных животных, уровень глюкозы в крови был существенно ниже по сравнению с DIO контрольной группой в течение всего периода лечения, где уровень глюкозы в крови натошак существенно изменялся на 2-ой и 21-ый день исследования. На Фигуре 62 показано сравнение MyoMed-203-леченных DIO мышей с DIO контрольными мышами.

#### *Глюкозотолерантный тест*

15 Для перорального глюкозотолерантного теста (OGTT), мышам перорально вводили глюкозу в дозе 2 г/кг в объеме дозирования 10 мл/кг после 6-ти часового голодания. Измерения уровня глюкозы осуществления непосредственно перед введением и через 15, 30, 60 и 120 мин после введения глюкозы. Рассчитывали AUC, описывающую скорость выброса глюкозы у  
20 каждой мыши при проведении теста, используя формулу:

$$S = \int_a^b f(x) dx$$

25 MyoMed-203 продемонстрировало незначительный гипогликемический эффект у тучных мышей через 14 дней потери веса и лечения в соответствии с данными OGTT. Уровни глюкозы в крови у животных этой группы имели тенденцию до снижения через 30 минут после OGTT теста по сравнению с DIO контрольная группа. То же верно и для рассчитанных AUC, описывающих элиминацию глюкозы. Подобная тенденция продолжалась до 28-го дня исследования: существенное снижение уровня глюкозы через 120 мин наблюдали у MyoMed-  
30 203 леченной группы по сравнению со всеми контрольными группами; рассчитанная площадь под кривой элиминации глюкозы также имела тенденцию до снижения. На Фигуре 63 и Фигуре 64 показаны OGTT данные для дней 14 и

28, соответственно, у MyoMed-203-леченных DIO мышей и DIO контрольных мышей.

*Тест на толерантность к действию инсулина*

5 Для теста на толерантность к инсулину (ИТТ), мышам инъецировали внутривенно раствор рекомбинантного инсулина человека (Lilly, France; REF C620001K) а дозе 0,75 или 0,60 МЕ/г веса тела в объеме 5 мл/кг после 6-ти часового голодания. Определения уровня глюкозы осуществляли сразу до введения и через 15, 30, 60 и 120 мин после введения инсулина. Результаты скорости выброса глюкозы выражали в виде площади под кривой (AUC).

10 Существенное снижение уровня глюкозы наблюдали у MyoMed-203-леченных мышей через 120 минут после инъекции инсулина по сравнению со всеми контрольными группами. На Фигуре 65 представлены ИТТ результаты у MyoMed-203-леченных DIO мышей и DIO контрольных мышей.

3. Анализ тканей

15 3.1 *Протеомный и Вестерн-блоттинг анализ:*

3.1.1 *МСТ мышцы:*

*Протеомный анализ:*

20 Белки из замороженных образцов диафрагмы у мышей из ложн. группы, МСТ, и МСТ+соединение (n=3 на группу) измельчали в порошок в жидком азоте N<sub>2</sub>. После этого осуществляли масс-спектрометрию в главном центре DZHК масс-спектрометрии в Bad Nauheim, как описано на Konzer и др., *Methods in molecular biology*, 2013, 1005, 39-52. Определяли относительные соотношения для МСТ/ложн. и МСТ+соединение/МСТ, где только совпадения, которые считаются дифференциально выраженными и высоко достоверными (P<0,01), в 25 дальнейшем исследовали Вестерн-блоттингом.

*Вестерн-блоттинг анализ:*

30 Вестерн-блоттинг анализ осуществляли на замороженных образцах мышц ТА, которые гомогенизировали в RIPA буфере (50 ммоль/л Tris, 150 ммоль/л хлорида натрия, 1 ммоль/л EDTA, 1% NP-40, 0,25% натрий-дезоксихолат, 0,1% SDS, 1% Triton X-100; pH 7,4) или ослабляющем буфере (90 ммоль/л HEPES, 126 ммоль/л хлорида калия, 1 ммоль/л MgCl<sub>2</sub>, 50 ммоль/л EGTA, 8 ммоль/л АТР, 10 ммоль/л Креатинфосфата; pH 7,4), содержащем смесь ингибиторов протеазы (Inhibitor mix M, Serva, Heidelberg, Germany), обрабатывали ультразвуком и центрифугировали при 16000 x g в течение 5 мин. Определяли концентрацию

белка в супернатанте (BCA assay, Pierce, Bonn, Germany) и аликвоты (5 - 20 мкг) разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Белки переносили на мембрану поливинилиденфторида (PVDF) и инкубировали в течение ночи при 4°C со следующими первичными антителами: MAFbx (1/2000, Eurogentec, Seraing, Belgium), MuRF1 (1/1000, Myomedix Ltd., Neckargemünd, Germany), CARP (1/500, Myomedix Ltd., Neckargemünd, Germany), BAX (1/1000; Abcam, Cambridge, UK), и eIF2B-delta (1/200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Мембраны последовательно инкубировали с вторичным антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена, и специфические полосы визуализировали с помощью ферментативной хемилюминесценции (Super Signal West Pico, Thermo Fisher Scientific Inc., Bonn, Germany) и количественной денситометрии, используя пакет программного обеспечения 1D scan (Scanalytics Inc., Rockville, USA). После этого блоты нормировали к загрузочному контролю GAPDH (1/30000; HyTest Ltd, Turku, Finland). Все данные представляли в виде кратного изменения относительно ложн.

Было обнаружено, что уровни экспрессии 5 белков специфически отвечают на соединение, как указано путем сравнения МСТ и МСТ+MyoMed-946 протеом. Уровни экспрессии этих белков обобщены в Таблице 2.

Таблица 2

Ген	Функция	Группа	P-значение	Соотношение белка ( $\log_2$ )	$-\log_{10}$ P значение
eIF2B4	синтез белка	МСТ/ложн. МСТ+MyoMed-946/МСТ	0,005 0,005	-0,46 0,32	2,29 2,28
AS3MT	метилование	МСТ/ложн. МСТ+MyoMed-946/МСТ	0,008 0,009	0,16 -0,31	2,09 2,05
ATPAF1	окислительное фосфорилирование	МСТ/ложн. МСТ+MyoMed-946/МСТ	0,006 0,001	0,27 -0,68	2,26 3,69
GHDC	неизвестна	МСТ/ложн. МСТ+MyoMed-946/МСТ	0,005 0,005	0,54 -0,39	2,32 2,33
BAX	апоптоз	МСТ/ложн. МСТ+MyoMed-946/МСТ	0,005 0,006	0,97 -0,73	2,28 2,25

Это включало повышенную регуляцию eIF2B (дельта субъединица) и понижающую регуляцию BAX, которую затем подтверждали путем иммуноблоттинга, как можно увидеть из Фигур 33 - 35. eIF2B путь представляет

собой известный трансляционный регулятор синтез белка. eIF2B ранее был идентифицирован как MuRF1 взаимодействующий фактор, что свидетельствует о том, что MuRF1 опосредует истощение фактора инициации трансляции eIF2B при МСТ стрессе, но это действие снимается соединением. Дополнительно, соединение также модулирует про-апоптотический регулятор BAX, где этот белок повышенно регулируется у МСТ мышей по сравнению с ложными и нормализован у МСТ+ MyoMed-946 группе. У пациентов-людей с хронической сердечной недостаточностью, апоптоз увеличен в сердечных мышцах и тесно коррелирует со степенью атрофии (см., например, Adams и др., *J Am Coll Cardiol*, 1999, 33, 959-965 и Vescovo и др., *Heart*, 2000, 84, 431-437). Действительно, ранее было отмечено, что BAX повышен при сердечной кахексии и связан с повышенной MuRF1 экспрессией (см., например, Dalla Libera и др., *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286, C138-144 и Rezk и др., *PLoS One*, 2012, 7, e30276).

Как можно дополнительно увидеть из Фигур 36 - 38, протеомный анализ подтверждает, что увеличенная экспрессия белка MuRF1 у МСТ мышей предотвращается соединением MyoMed-946, при этом не наблюдается эффектов для MAFBx (другая ключевая атрофин Е3 лигаза). Это указывает на то, что основной механизм соединений, по-видимому, специфичен для MuRF1, чего можно было бы ожидать на основании предварительных исследований *in vitro*. Также известно, что MuRF1 взаимодействует с различными субстратами, одним из них, в особенности, является CARP (представитель семейства белков мышечных анкириновых повторов (MARPs)), который является предполагаемым белком на основе ядерного и саркомера (титина) с транскрипционными функциями (см., например, Miller и др., *J Mol Biol*, 2003, 333, 951-964). Известно, что CARP повышенно регулирован при состояниях, связанных со стрессом, и ассоциирован с сократительными дисфункциями и мышечной атрофией (см., например, Laue и др., *The FEBS journal*, 2009, 276, 669-684 и Moulik и др., *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54, 325-333). В соответствии с такими доказательствами, наблюдали повышение экспрессии CARP у МСТ-стрессовых мышей, в то время как этот эффект отменялся у мышей, которых кормили MyoMed-946, что свидетельствует о том, что это соединение может притуплять CARP экспрессию путем его ингибирования на MuRF1, что, в свою очередь, может способствовать поддержанию мышечной массы и функции.

### 3.1.2 CHF мыши:

Для анализа молекулярных механизмов, лежащих в основе наблюдаемых физиологических изменений и благоприятных эффектов MyoMed-946-леченных мышей, страдающих от CHF, осуществляли сравнительный количественный протеомный анализ, а также вестерн-блоттинг анализ ткани диафрагмы от ложн., CHF, и CHF + MyoMed-946-леченных мышей.

#### *Протеомный анализ:*

Протеомный анализ на основе масс-спектрометрии осуществляли в главном центре DZHK Core Facility, Bad Nauheim, Germany. Полученные MS необработанные данные обрабатывали с помощью MaxQuant (1.6.0.1), используя поисковую систему Andromeda и базу данных Uniprot для *Mus musculus* (по состоянию на 20 апреля 2017 г.). С частотой ложных открытий 1% (как на уровне пептида, так и белка), было идентифицировано >2600 белковых групп. Применяя протокол восстановительного диметилирования (см. Voersem и др., *Nat Protoc*, 2009, 4, 484–494), получали попарное относительное сравнительное количественное определение (соотношения) между белками из CHF + MyoMed-946, CHF, и ложн. состояниями, которые были подвергнуты статистическому анализу на предмет значительных различий с использованием стандартных статистических тестов. Было идентифицировано несколько белков, которые являются статистически отличными (например, TNNT3, Timm9, Ccdc5, Ad1, Ptges3, и Ndufa3). После применения множественной проверки гипотез (Benjamini–Hochberg; скорректированное  $P < 0,05$ ) для сравнения CHF мышей с питаем соединением и без питания соединением, только Mrps5 (митохондриальный рибосомный белок 5), митохондриально-цитозольный челночный белок, отвечающий за инициацию и удлинение белка в митохондриальной рибосоме, оставался белком со значительной активацией ( $P = 0,02$ ; *Фигура 4A*) и его в дальнейшем исследовали с помощью вестерн-блоттинга, как описано ниже.

Как можно увидеть из *Фигуры 39*, вестерн-блоттинг анализ диафрагмы всех животных, включенных в CHF исследование, обнаружил существенное уменьшение Mrps5 экспрессии в CHF группе по сравнению с ложн. контрольной группой, что было изменено на обратное путем питания с использованием соединения MyoMed-946. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная погрешность среднего.

*Вестерн-блоттинг анализ:*

Для вестерн-блоттинг анализов, замороженную диафрагму гомогенизировали в ослабляющем буфере (90 ммоль/л HEPES, 126 ммоль/л хлорида калия, 36 ммоль/л хлорида натрия, 1 ммоль/л хлорида магния, 50 ммоль/л EGTA, 8 ммоль/л АТФ, и 10 ммоль/л креатин фосфата, рН 7,4), содержащего смесь ингибиторов протеаз (Inhibitor Mix M, Serva, Heidelberg, Germany) и обрабатывали ультразвуком. Определяли концентрацию белка в супернатанте (метод с бисцинониновой кислотой, Pierce, Bonn, Germany), и аликвоты разделяли (5–20 мкг) путем электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Белки переносили на поливинилиденфторидную мембрану и инкубировали в течение ночи при 4 °С, используя следующие первичные антитела: порин и телетонин (оба 1/1000, Abcam, Cambridge, UK), MRPS-5 (1/500, Thermo Fisher, Rockford, IL, USA), MuRF1 и MuRF2 (оба 1/1000; коммерчески доступные от Myomedix, Neckargemünd, Germany), и Tom20 (1:200, Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Germany). Мембраны последовательно инкубировали с вторичным антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена, специфичные полосы визуализировали путем ферментативной хемилюминесценции (Super Signal West Pico, Thermo Fisher Scientific Inc., Bonn, Germany), и количественно определяли денситометрию с использованием пакета программного обеспечения для одномерного сканирования. (Scanalytics Inc., Rockville, MD, USA). Измерения нормировали к нагрузочному контролю GAPDH (1/30 000; HyTest Ltd, Turku, Finland) или  $\alpha$ -тубулину (1:1000, Santa Cruz Biotechnologies). Все данные были представлены в виде кратности изменения относительно ложн.

Как можно увидеть из Фигур 40 - 42, MuRF1 и MuRF2 экспрессия существенно повышено регулируется в CHF группе, и это предотвращается путем лечения с применением соединения MyoMed-946 (Фигуры 40 и 41). При количественном определении экспрессии телетонина, MuRF1 целевого белка, наблюдали тенденцию ( $P = 0,08$ ) к уменьшению экспрессии в CHF группе, которая не была очевидной в группе, леченной соединением MyoMed-946 (Фигура 42).



### 3.1.3 B16F10 мыши (мыши с опухолью):

Экспрессию белка MuRF1, Nox 2 и LC3 I/II в мышечной ткани B16F10 мышей определяли, как описано выше для MCT и CHF мышей. Дополнительно, определяли уровень нитротирозина, маркера активных форм кислорода.

5 Как можно увидеть из Фигур 43 - 46, MuRF1 экспрессия существенно повышено регулируется в опухолевой группе, и это предотвращается путем лечения с применением соединений MyoMed-946 и MyoMed-205 (Фигура 43). Кроме того, экспрессия Nox 2, который представляет собой известные  
10 эндогенные активные формы кислорода (ROS), а также тканевой уровень нитротирозина существенно повышенно регулирован у мышей в опухолевой группе, в то время как у мышей в группе опухоль + MyoMed-946 и в группе опухоль + MyoMed-205 количество этих видов существенно уменьшено в мышечной ткани (Фигуры 44 и 45). С другой стороны, уровни экспрессии LC3  
15 I/II, которые представляют собой ключевые белки, вовлеченные в аутофагоцитоз, понижено регулированы в опухолевой группе, что не наблюдается в группах опухоль + MyoMed-946 и опухоль + MyoMed-205 (Фигура 46).

## 3.2 Измерения активности ферментов:

### 3.2.1 CHF мыши:

20 Поскольку данные протеомного профилирования свидетельствуют о нарушении митохондриального гомеостаза, осуществляли измерения ферментативной активности ключевых митохондриальных ферментов в тканевой диафрагме мышей CHF.

Диафрагмальную ткань гомогенизировали в смягчающем буфере, и  
25 аликвоты использовали для измерений активности ферментов. Активности ферментов лактатдегидрогеназа (EC 1.1.1.27), пируваткиназа (EC 2.7.1.40), сукцинатдегидрогеназа (SDH, EC 1.3.5.1), цитратсинтаза (CS, EC 2.3.3.1),  $\beta$ -гидроксиацил-КОА дегидрогеназа (EC 1.1.1.35), и митохондриальный комплекс I измеряли спектрофотометрически, как более подробно было описано ранее  
30 (Mukherjee и др., *J Biol Chem*, 1976, 251, 2155–2160; Vanderlinde и др., *Ann Clin Lab Sci*, 1985, 15, 13–31; Dzeja и др., *Mol Cell Biochem*, 1999, 201, 33–40; Takashi и др., *Biochim Biohphys Acta*, 1979, 574, 258–267; Schwarzer и др., *J Physiol*, 2014, 592, 3767–3782). Данные активности ферментов представлены в виде кратности изменение относительно ложн.

Как можно увидеть из Фигур 47 - 51 ферментативная активность митохондриальных ферментов, включая цитратсинтазу (Фигура 47), сукцинатдегидрогеназу (Фигура 48), и митохондриальный комплекс I (Фигура 49), существенно уменьшена на 21, 28, и 27%, соответственно, в диафрагме СНФ животных по сравнению с ложн. Не наблюдали отличий для креатинкиназы. Количество митохондрий в ткани диафрагмы, что оценивали по экспрессии белка экспрессии митохондриального порина (Фигура 50) и ТОМ-20 (Фигура 51), также были существенно уменьшены у СНФ мышей. В соответствии с влиянием на митохондриальные функции, лечение с применением соединения MyoMed-946 частично улучшает активность ферментов цитратсинтаза, сукцинатдегидрогеназа, и митохондриальный комплекс I (Фигуры 47 - 49) и приводит к практически нормальным уровням порина и незначительному, но статистически достоверному улучшению ТОМ-20 экспрессии (Фигуры 50 и 51).

В отличие от этого, при оценивании цитоплазматических ферментов гликолиза и метаболизма жирных кислот (гликолиз: пируваткиназа и лактатдегидрогеназа; метаболизм жирных кислот:  $\beta$ -гидроксиацил-КОА дегидрогеназа), не было обнаружено отличий между этими тремя группами.

### 3.2.2 *B16F10* мыши (мыши с опухолью):

Определяли активности ферментов цитратсинтаза и митохондриальный комплекс I в мышечной ткани B16F10 инокулированных мышей, как описано выше для СНФ мышей.

Как можно увидеть из Фигур 52 и 53, активности ферментов митохондриальных ферментов цитратсинтаза (Фигура 52) и митохондриальный комплекс I (Фигура 53) были существенно уменьшены в мышечной ткани опухолевой группы по сравнению с ложн. Лечение с применением соединений MyoMed-946 и MyoMed-205 частично или полностью восстанавливает активности ферментов цитратсинтаза и митохондриальный комплекс I в мышечной ткани B16F10 инокулированных мышей (Фигуры 52 и 53).

## 4. *Клеточная культура C2C12 мышечных трубочек, ПЛР с обратной транскрипцией*

C2C12 мышечные трубочки инкубировали с соединением MyoMed-946 или без соединения MyoMed-946 в течение 20 минут при конечной концентрации 10 мкмоль/л. После инкубационного периода, общую РНК выделяли из C2C12 клеток и обратно транскрибировали в кДНК, используя рандомные гексамеры и

обратную транскриптазу Sensiscript (Qiagen, Hilden, Germany). Аликвоту кДНК использовали для количественной ПЦР с обратной транскрипцией, применяя систему Light Cycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Экспрессию специфических генов нормировали к экспрессии гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы (HPRT)-мРНК. Для количественной оценки применяли технологию резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET) MuRF-1 экспрессии, используя следующие праймеры (TIB MolBiol, Berlin, Germany) и условия: HPRT: 5'-CTCATggACTgATTATggACAggAC-3' (SEQ IN NO:1) и 5'-gCAggTCAgCAAAgAACTTATAgCC-3' (SEQ ID NO:2), 60°C аннелирование; MuRF-1: 5'-gATgTgCAAggAACACgAA-3' (SEQ ID NO:3), 5'-CCTTCACCTggTggCTATTC-3' (SEQ ID NO: 4), LC640-gCACAaggAgCAAgTAggCACCTCAC-PH (SEQ ID NO: 5), 5'-gCCTggTgAgCCCCAAACACCT-FL (SEQ ID NO:6),

аннелирование 58°C. LC640 обозначает LC Red 640, флуоресцентный краситель. FL обозначает флуоресцеин. PH обозначает фосфатную группу (блокирует свободную 3'-гидроксильную группу от нежелательного удлинения полимеразой).

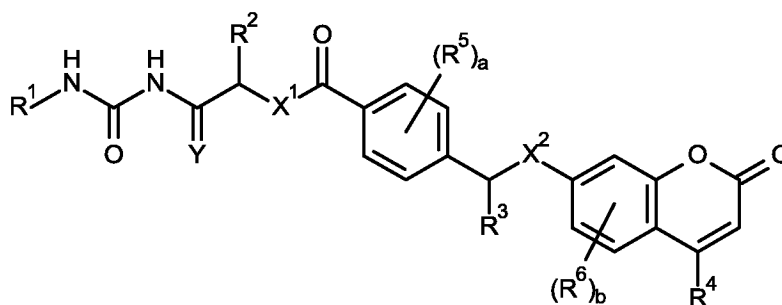
Как можно увидеть из Фигуры 54, повышенная экспрессия белка MuRF1 у МСТ мышей была предотвращена соединением MyoMed-946.

#### 20 5. *Статистический анализ:*

Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  СПС. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим ретроспективным анализом Бонферрони использовался для сравнения групп, в то время как двусторонний дисперсионный анализ с повторными измерениями с последующим ретроспективным анализом Бонферрони использовался для оценки сократительной функции (GraphPad Prism). Значимость была принята как  $P < 0,05$ .

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

## 1. Соединение общей формулы I



(I)

где

$R^1$  представляет собой водород или группу  $-CH_2R^{1a}$ , где  $R^{1a}$  выбирают из группы, включающей водород,  $C_1$ - $C_3$ -алкил, фенил, где фенил не замещен или может нести 1, 2 или 3 радикала, независимо выбранных из галогена, циано,  $C_1$ - $C_3$ -алкила,  $C_1$ - $C_3$ -галоалкила и  $C_1$ - $C_3$ -алкокси; и 5-ти - 10-ти членное гетероароматическое кольцо, содержащее от 1 до 4 гетероатомов или гетеро-групп, независимо выбранных из группы, включающей N,  $NR^c$ , O и S в качестве кольцевого члена, где 5-ти - 10-ти членное гетероароматическое кольцо не замещено или может нести 1, 2 или 3 радикала  $R^7$ ;

$R^2$  выбирают из группы, включающей водород, метил и фторированный метил;

$R^3$  выбирают из группы, включающей водород, метил и фторированный метил;

$R^4$  выбирают из группы, включающей водород и  $C_1$ - $C_4$ -алкил; каждый  $R^5$  независимо выбирают из группы, включающей галоген, циано,  $C_1$ - $C_3$ -алкил,  $C_1$ - $C_3$ -галоалкил,  $C_1$ - $C_3$ -алкокси и  $C_1$ - $C_3$ -галоалкокси;

каждый  $R^6$  независимо выбирают из группы, включающей галоген, циано,  $C_1$ - $C_3$ -алкил,  $C_1$ - $C_3$ -галоалкил,  $C_1$ - $C_3$ -алкокси и  $C_1$ - $C_3$ -галоалкокси;

каждый  $R^7$  независимо выбирают из группы, включающей галоген, циано,  $C_1$ - $C_3$ -алкил,  $C_1$ - $C_3$ -галоалкил,  $C_1$ - $C_3$ -алкокси и  $C_1$ - $C_3$ -галоалкокси;

$X^1$  представляет собой  $NR^a$  или O;

$X^2$  представляет собой  $NR^b$ , O или S;

Y представляет собой атом кислорода или два атома водорода;  
 $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$  каждый независимо выбирают из группы, включающей водород и  $C_1$ - $C_4$ -алкил;

a представляет собой 0, 1, 2, 3 или 4; и

5 b представляет собой 0, 1, 2 или 3;

и его фармацевтически приемлемые соли.

2. Соединение по пункту 1, где  $R^1$  выбирают из группы, включающей водород и группу  $-CH_2R^{1a}$ , где  $R^{1a}$  выбирают из группы, включающей водород, метил и 5-ти - 6-ти членное моноциклическое гетероароматическое кольцо, содержащее от 1 до 3 гетероатомов, в особенности 1 гетероатом, независимо выбранный из группы, включающей N, O и S, в качестве кольцевого члена, где 5-ти - 6-ти членное моноциклическое гетероароматическое кольцо не замещено или несет 1 радикал  $R^7$ , где  $R^7$  выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси.

3. Соединение по пункту 2, где  $R^1$  выбирают из группы, включающей водород и группу  $-CH_2R^{1a}$ , где  $R^{1a}$  выбирают из группы, включающей водород и незамещенное 5-ти - 6-ти членное моноциклическое гетероароматическое кольцо, содержащее от 1 до 3 гетероатомов, в особенности 1 гетероатом, независимо выбранный из группы, включающей N, O и S, в качестве кольцевого члена; где  $R^1$  представляет собой в особенности группу  $-CH_2R^{1a}$ , где  $R^{1a}$  представляет собой незамещенное 5-ти - 6-ти членное моноциклическое гетероароматическое кольцо, содержащее от 1 до 3 гетероатомов, в особенности 1 гетероатом, независимо выбранный из группы, включающей N, O и S, в качестве кольцевого члена.

4. Соединение по одному из пунктов 1 - 3, где

$R^2$  представляет собой водород или метил;

30  $R^3$  представляет собой водород;

$R^4$  представляет собой метил;

каждый  $R^5$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси;

каждый  $R^6$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси;

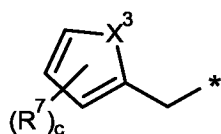
$X^1$  представляет собой NH или O;

$X^2$  представляет собой O;

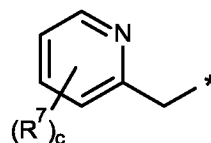
5 а представляет собой 0, 1 или 2; и

б представляет собой 0 или 1.

5. Соединение по пункту 1, где  $R^1$  выбирают из группы  $CH_2-I'$  или  $CH_2-II'$



( $CH_2-I'$ )



( $CH_2-II'$ )

10

где \* указывает точку присоединения к атому азота мочевины;

каждый  $R^7$  независимо выбирают из группы, включающей галоген, циано,  $C_1$ - $C_3$ -алкил,  $C_1$ - $C_3$ -галоалкил,  $C_1$ - $C_3$ -алкокси и  $C_1$ - $C_3$ -галоалкокси;

$X^3$  представляет собой  $NR^c$ , O или S;

15  $R^c$  выбирают из группы, включающей водород и  $C_1$ - $C_4$ -алкил; и

с представляет собой 0, 1, 2 или 3.

6. Соединение по пункту 5, где

$R^2$  представляет собой водород или метил;

20  $R^3$  представляет собой водород;

$R^4$  представляет собой метил;

каждый  $R^5$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси;

каждый  $R^6$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси;

25

каждый  $R^7$  независимо выбирают из группы, включающей галоген,  $C_1$ - $C_3$ -алкил и  $C_1$ - $C_2$ -алкокси;

$X^1$  представляет собой NH или O;

$X^2$  представляет собой O;

30  $X^3$  представляет собой O или S;

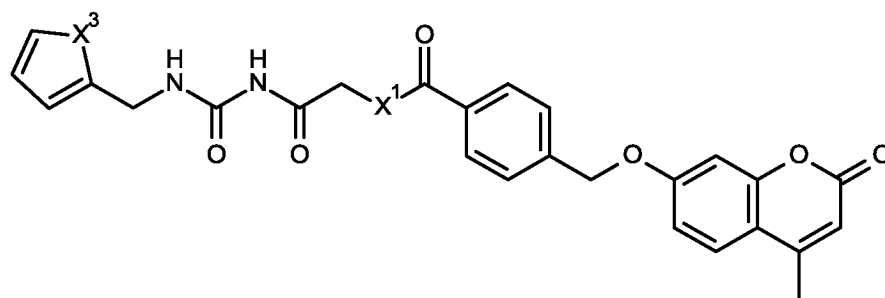
а представляет собой 0, 1 или 2;

- b представляет собой 0 или 1; и  
 c представляет собой 0 или 1.

7. Соединение по пункту 6, где

- 5  $R^2$  представляет собой водород;  
 $R^3$  представляет собой водород;  
 $R^4$  представляет собой метил;  
 $X^1$  представляет собой NH или O;  
 $X^2$  представляет собой O;  
 10  $X^3$  представляет собой O или S;  
 a представляет собой 0;  
 b представляет собой 0; и  
 c представляет собой 0.

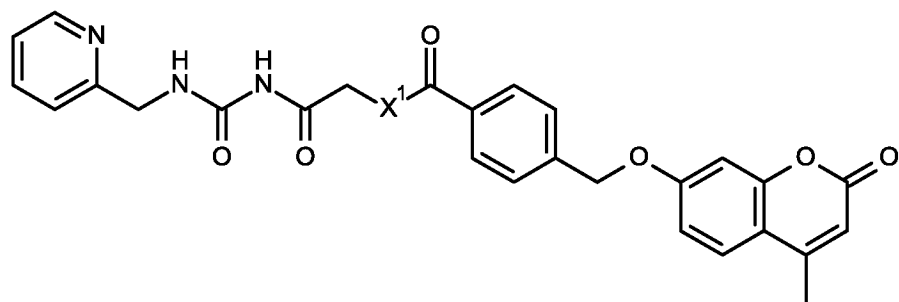
- 15 8. Соединение формулы I, как определено в одном из пунктов 1 - 7, которое соответствует формуле I-A,



(I-A)

где

- 20  $X^1$  представляет собой NH или O; и  
 $X^3$  представляет собой O или S;  
 и его фармацевтически приемлемые соли,  
 или формуле I-B,

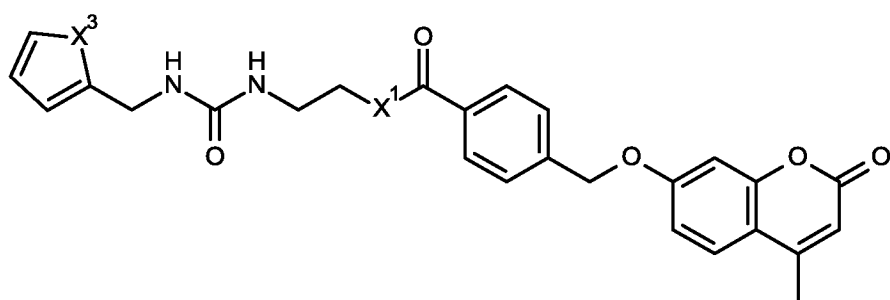


(I-B)

где

$X^1$  представляет собой NH или O;

5 и его фармацевтически приемлемые соли,  
или формуле I-C,



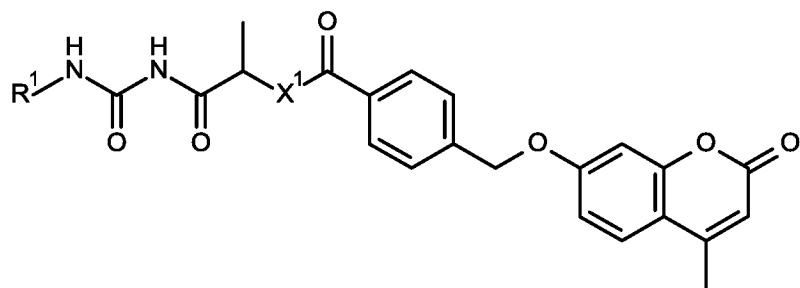
(I-C)

где

10  $X^1$  представляет собой NH или O; и

$X^3$  представляет собой O или S;

и его фармацевтически приемлемые соли,  
или формуле I-D,



(I-D)

15

где

$R^1$  представляет собой водород или метил; и

$X^1$  представляет собой NH или O;



и его фармацевтически приемлемые соли.

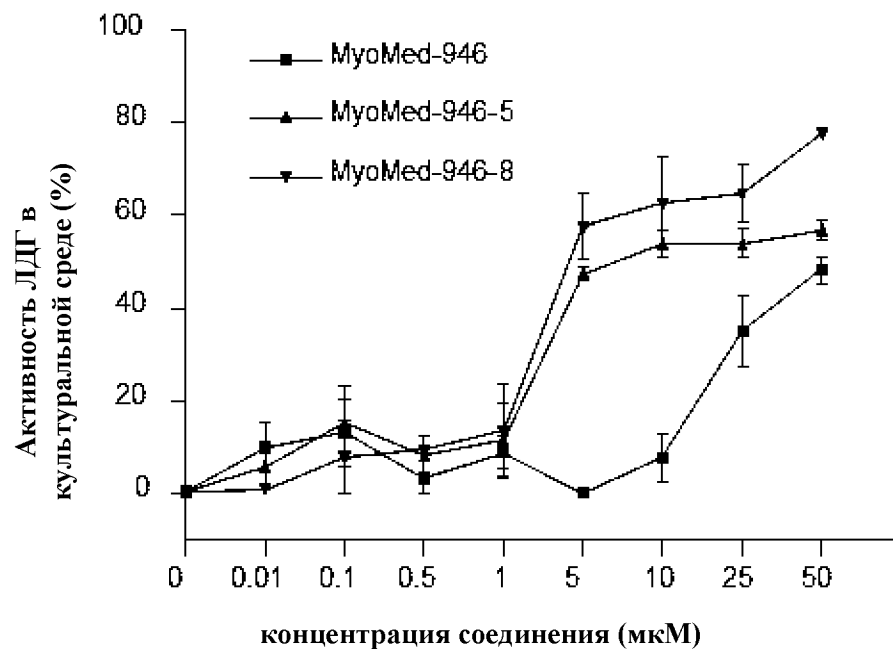
9. Соединение [2-(2-фурилметилкарбамоиламино)-2-оксо-этил] 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензоат и его фармацевтически приемлемые соли.
10. Соединение 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]-N-[2-(2-тиенилметилкарбамоиламино)этил]бензамид и его фармацевтически приемлемые соли.
11. Соединение [2-оксо-2-(2-пиридилметилкарбамоиламино)этил] 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензоат и его фармацевтически приемлемые соли.
12. Соединение формулы I, как определено в пункте 1, которое выбирают из N-[2-(2-фурилметилкарбамоиламино)-2-оксо-этил]-4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензамида, [2-оксо-2-(2-тиенилметилкарбамоиламино)этил] 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]-бензоата, и 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]-N-[2-оксо-2-(2-тиенилметилкарбамоиламино)этил]-бензамида, и его фармацевтически приемлемых солей.
13. Соединение формулы I, как определено в пункте 1, которое выбирают из (1-метил-2-оксо-2-уреидо-этил) 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензоата и [1-метил-2-(метилкарбамоиламино)-2-оксо-этил] 4-[(4-метил-2-оксо-хромен-7-ил)оксиметил]бензоата, и его фармацевтически приемлемых солей.
14. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одно соединение общей формулы I, как определено в одном из пунктов 1 - 13 или по меньшей мере одну его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

15. Соединение по одному из пунктов 1 - 13 или его фармацевтически приемлемая соль, для применения в качестве лекарственного средства.
- 5 16. Соединение по одному из пунктов 1 - 13 или его фармацевтически приемлемая соль, для применения для лечения или профилактики состояний истощения мышечной ткани.
- 10 17. Соединение по одному из пунктов 1 - 13 или его фармацевтически приемлемая соль для применения для лечения или профилактики атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей в результате одного из следующих заболеваний или состояний: застойная сердечная недостаточность, хроническая сердечная недостаточность, злокачественное новообразование, лечение злокачественного новообразования с применением миотоксических и/или кардиотоксических веществ, таких как доксорубин, врожденная миопатия, СПИД, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), хронические заболевания почек, почечная недостаточность, диабет, тяжелые ожоги, саркопения при старении, снижение кровоснабжения, временная или длительная иммобилизация, длительная искусственная вентиляция легких, денервация,
- 15 20 продолжительное состояние невесомости и недостаточность питания.
- 25 18. Соединение по одному из пунктов 1 - 13 или его фармацевтически приемлемая соль, для применения для лечения или профилактики состояний, которые связаны с увеличенной экспрессией Muscle RING Finger 1 (MuRF1), в особенности миопатий, которые связаны с увеличенной экспрессией Muscle RING Finger 1 (MuRF1).
- 30 19. Соединение для применения по пункту 18, где миопатию выбирают из миопатии критических состояний, немалиновой миопатии, воспалительной миопатии, миопатии вследствие диабета, миопатии вследствие лёгочной гипертензии, миопатии вследствие хронической сердечной недостаточности, миопатии вследствие почечной недостаточности и миопатии вследствие опухолевой кахексии.

20. Соединение по одному из пунктов 1 - 13 или его фармацевтически приемлемая соль, для применения для лечения или профилактики кардиологических симптомов, связанных с систолической или диастолической дисфункцией.
- 5
21. Соединение по одному из пунктов 1 - 13 или его фармацевтически приемлемая соль, для применения для лечения или профилактики диабета.
22. Соединение по одному из пунктов 1 - 13 или его фармацевтически приемлемая соль, для применения для лечения или профилактики
- 10 - атрофии скелетных или сердечных мышц, возникающей в результате или связанной с сердечной недостаточностью со сниженной фракцией выброса (HF-rEF), сердечной недостаточностью с сохранённой фракцией выброса (HF-pEF), гипертонией или опухолевой кахексией;
- 15 - мышечной атрофии и/или кардиотоксичности, индуцированной Доксорубицином;
- саркопении и/или кардиомиопатии при старении;
- мышечной атрофии вследствие хронического заболевания почек;
- слабости диафрагмы вследствие искусственной вентиляции легких или
- 20 застойной сердечной недостаточности;
- врождённой миопатии, в особенности имеющей общее происхождение мышечной атрофии;
- индуцированной диабетом мышечной атрофии; и/или
- диабета.
- 25
23. Способ лечения или предотвращения состояния, как определено в одном из пунктов 16 -22, который включает стадию введения терапевтически эффективного количества соединения, выбранного из соединений общей формулы I, как определено в одном из пунктов 1 - 13, или их
- 30 фармацевтически приемлемых солей нуждающемуся в этом субъекту.

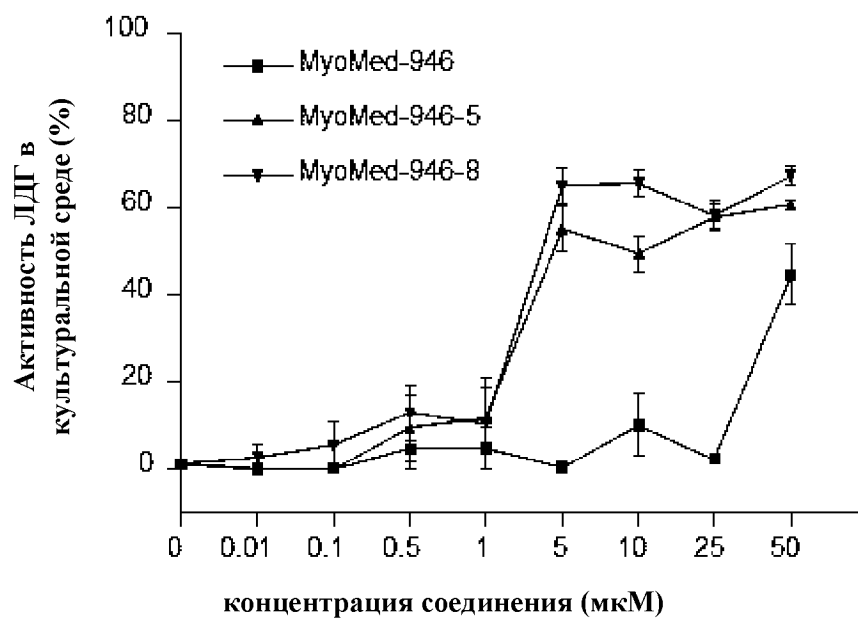
ФИГУРА 1

Миобласт

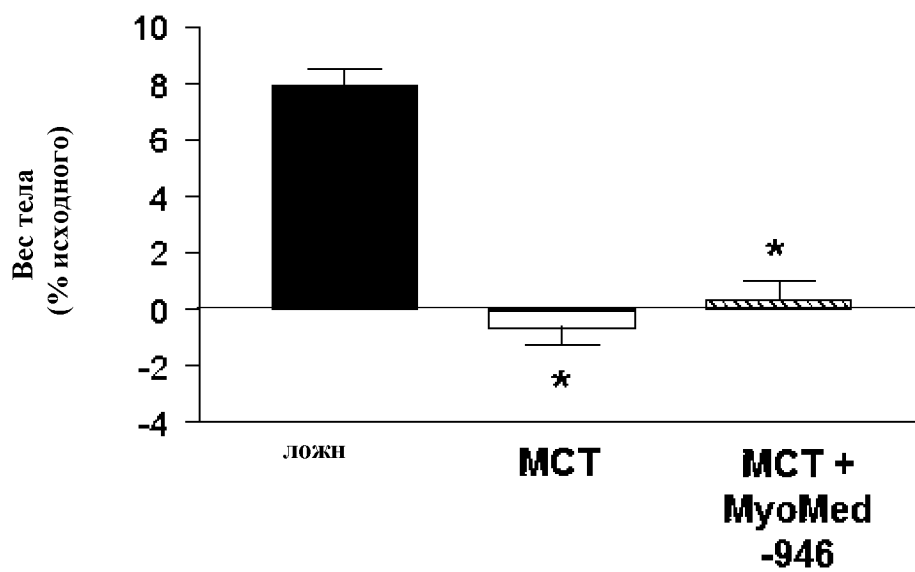


ФИГУРА 2

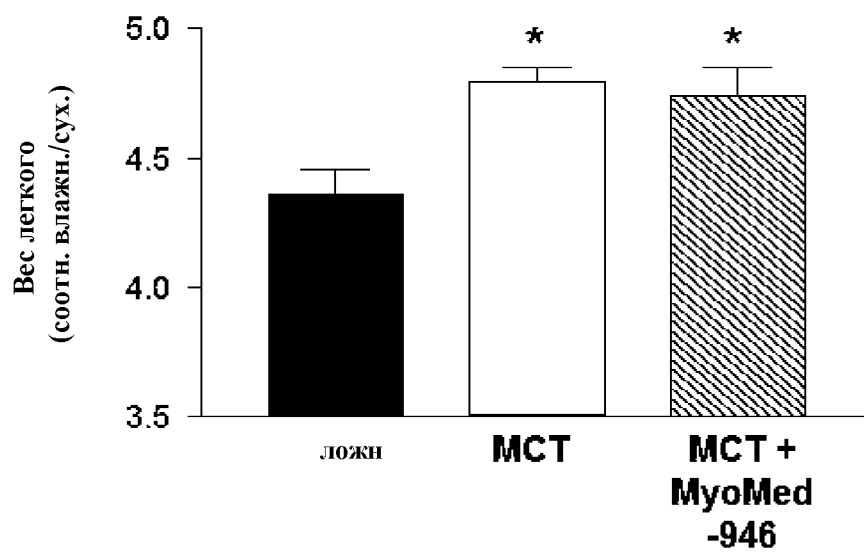
Миоцит



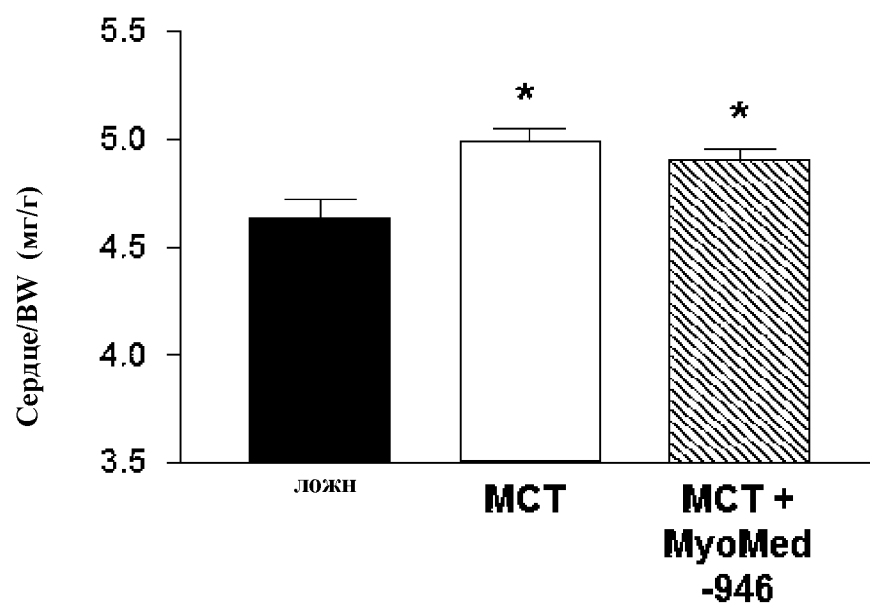
ФИГУРА 3



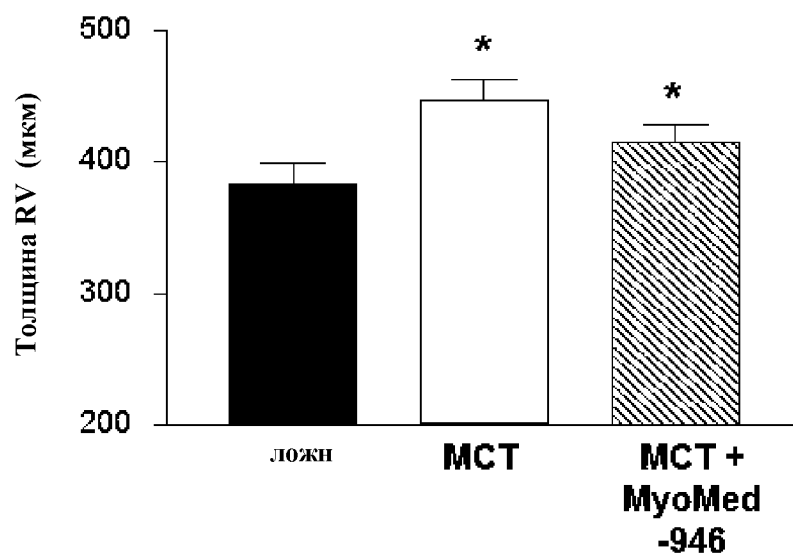
ФИГУРА 4



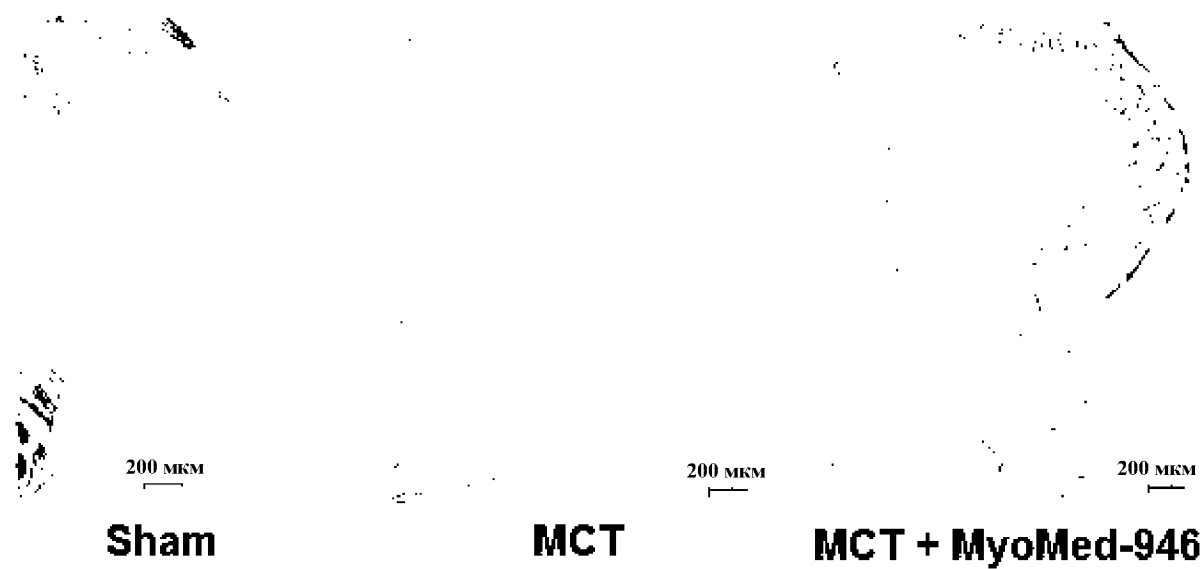
ФИГУРА 5



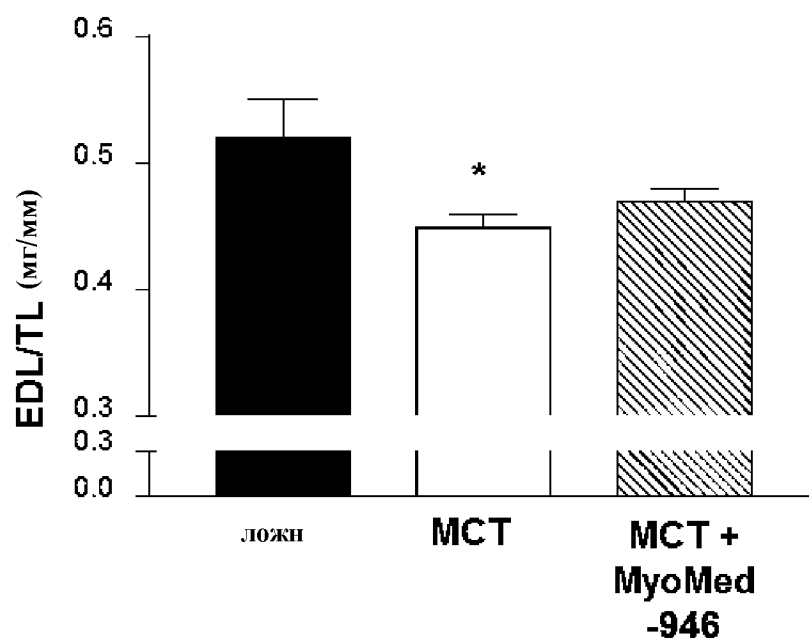
ФИГУРА 6



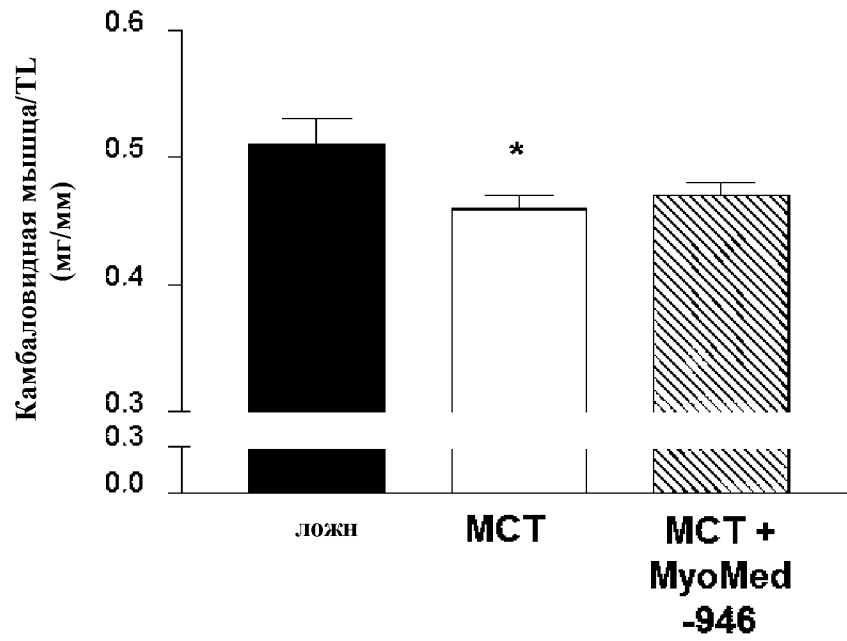
ФИГУРА 7



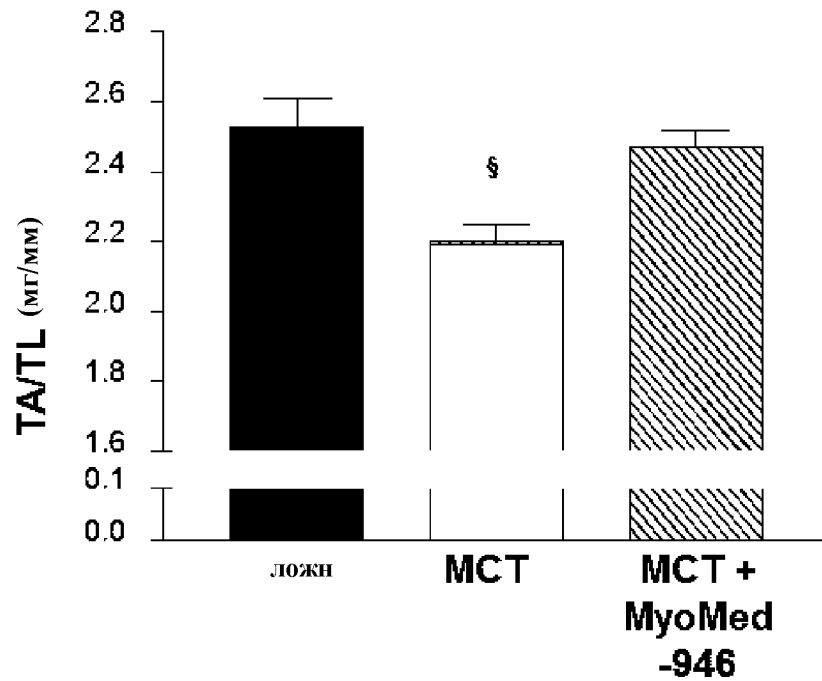
ФИГУРА 8



ФИГУРА 9

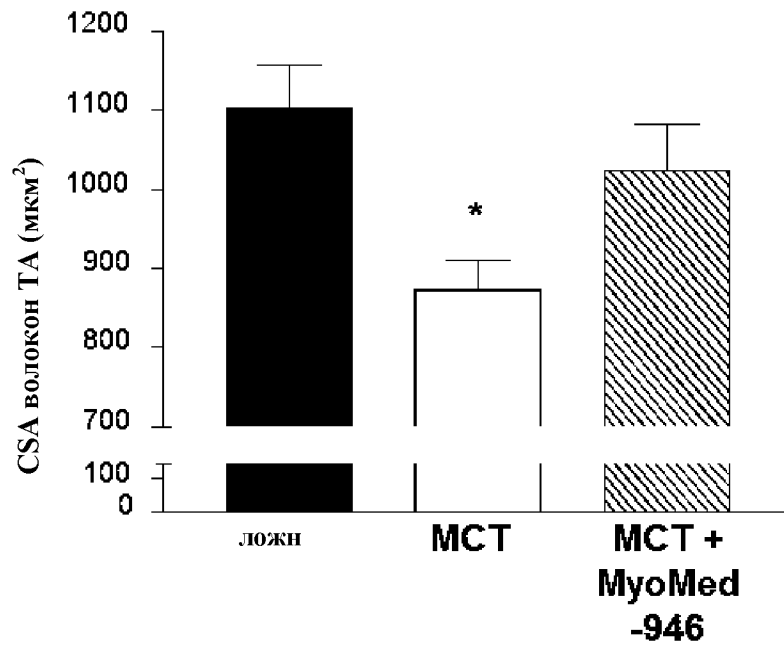


ФИГУРА 10





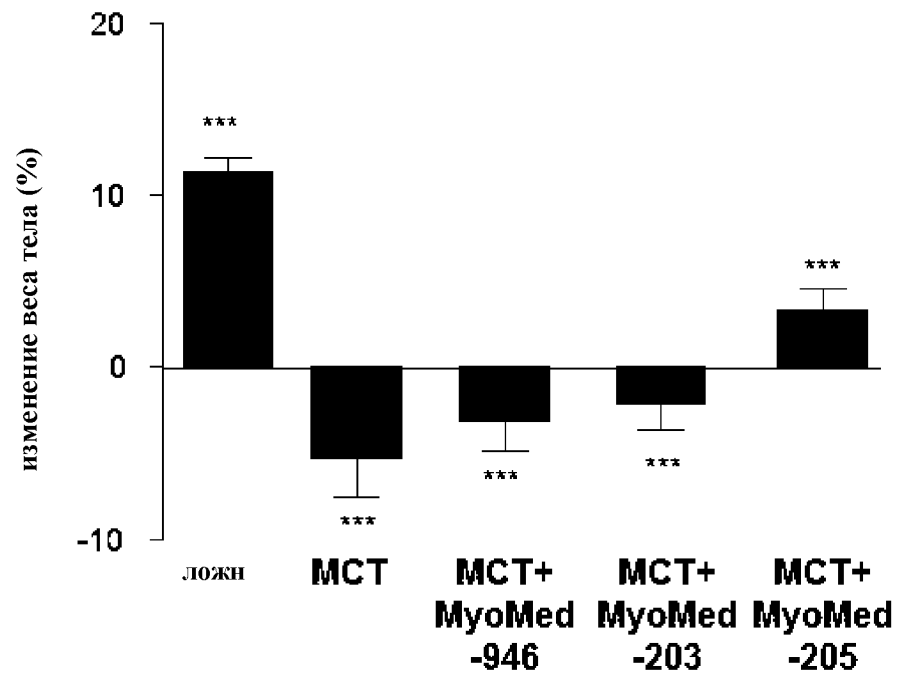
ФИГУРА 11



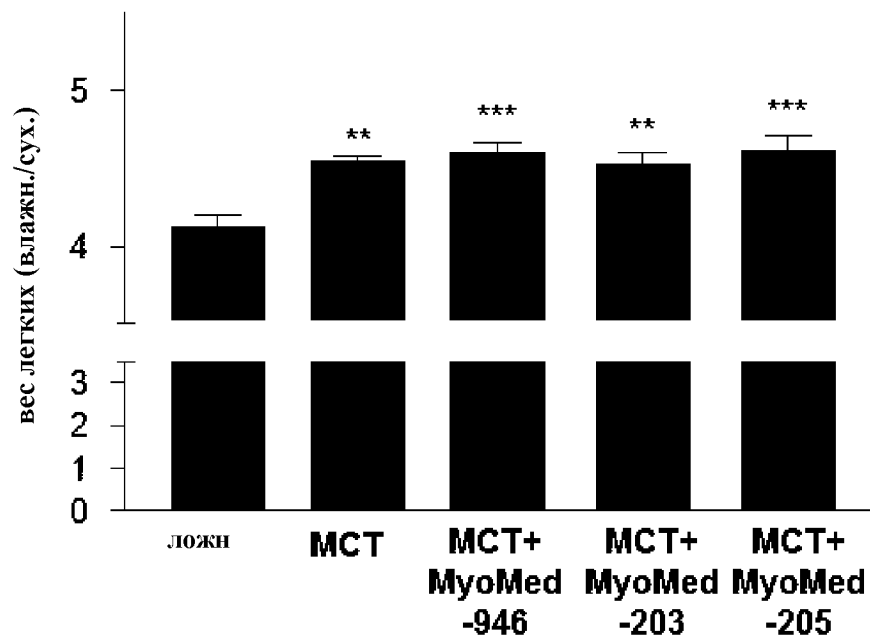
ФИГУРА 12



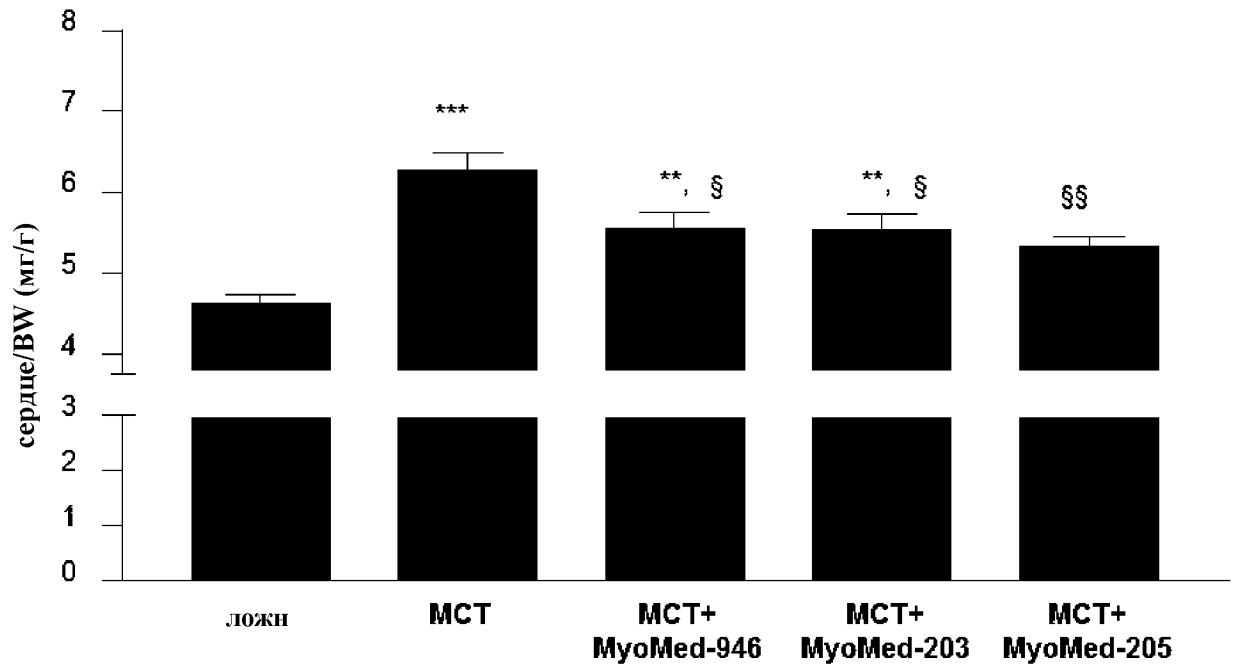
ФИГУРА 13



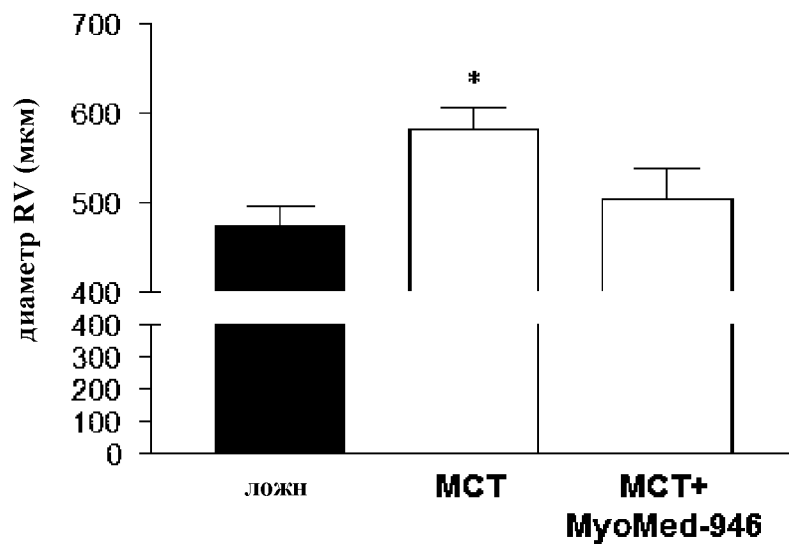
ФИГУРА 14



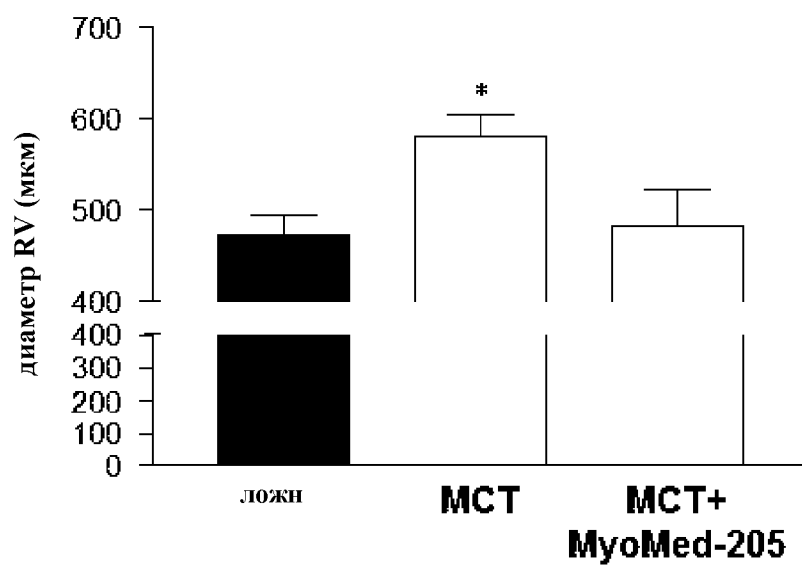
ФИГУРА 15



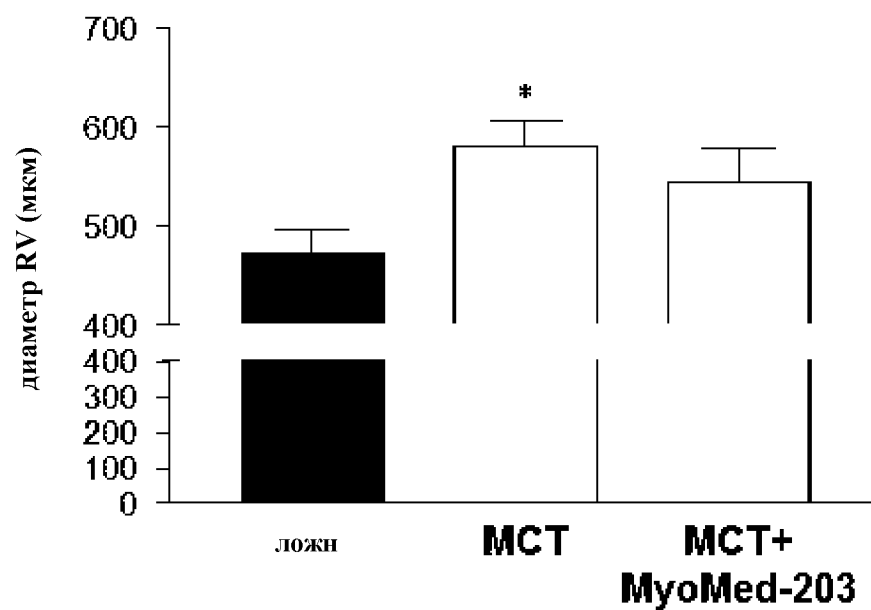
ФИГУРА 16



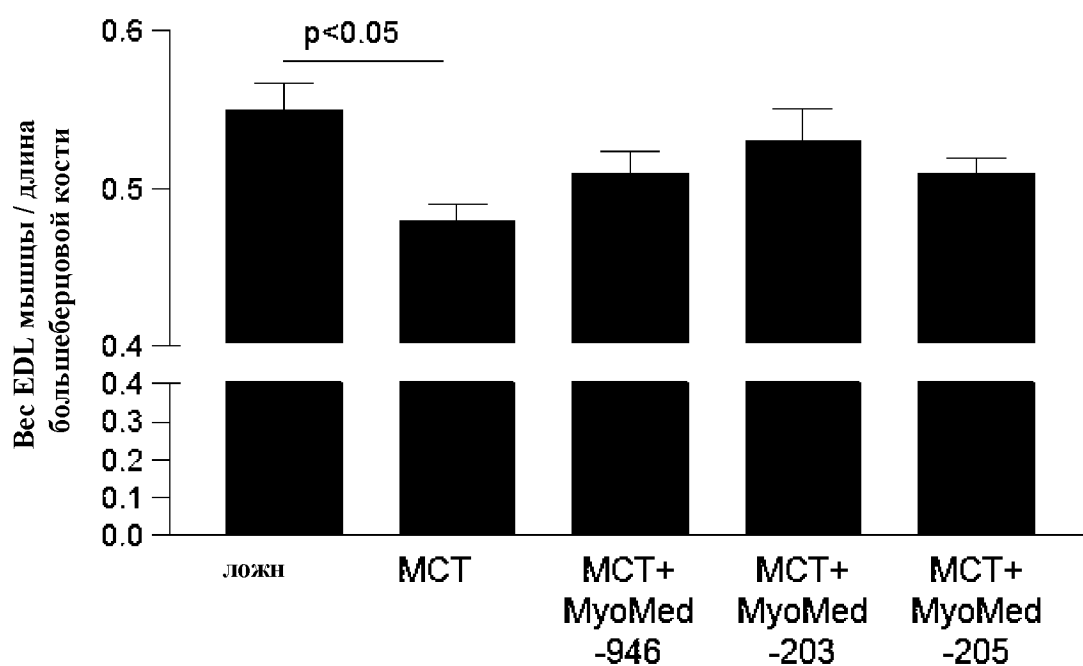
ФИГУРА 17



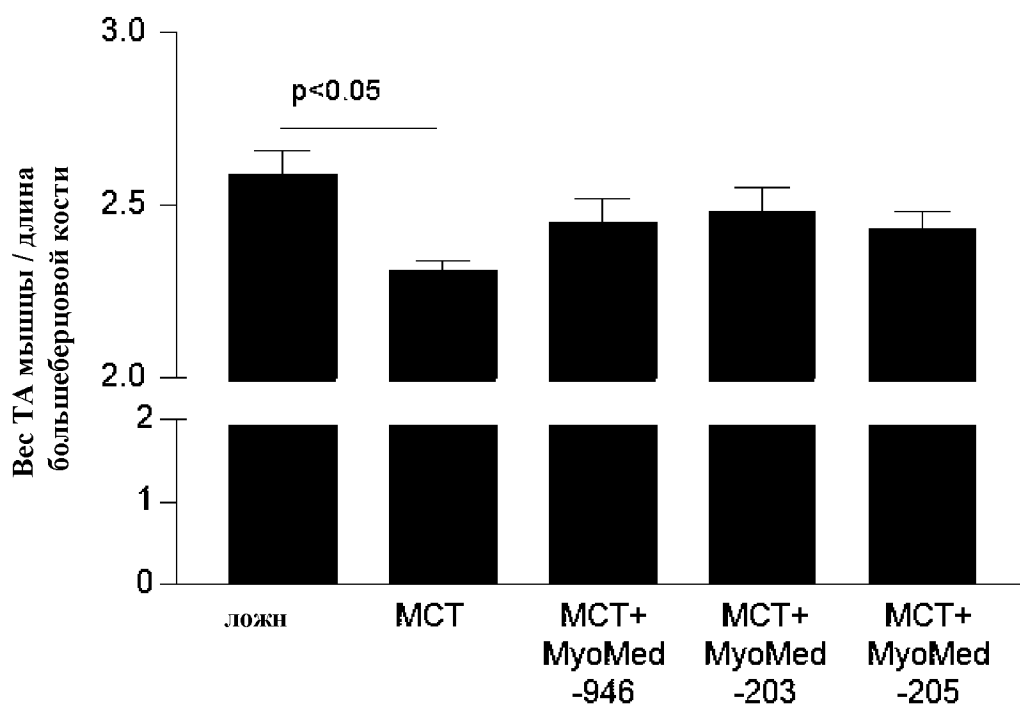
ФИГУРА 18



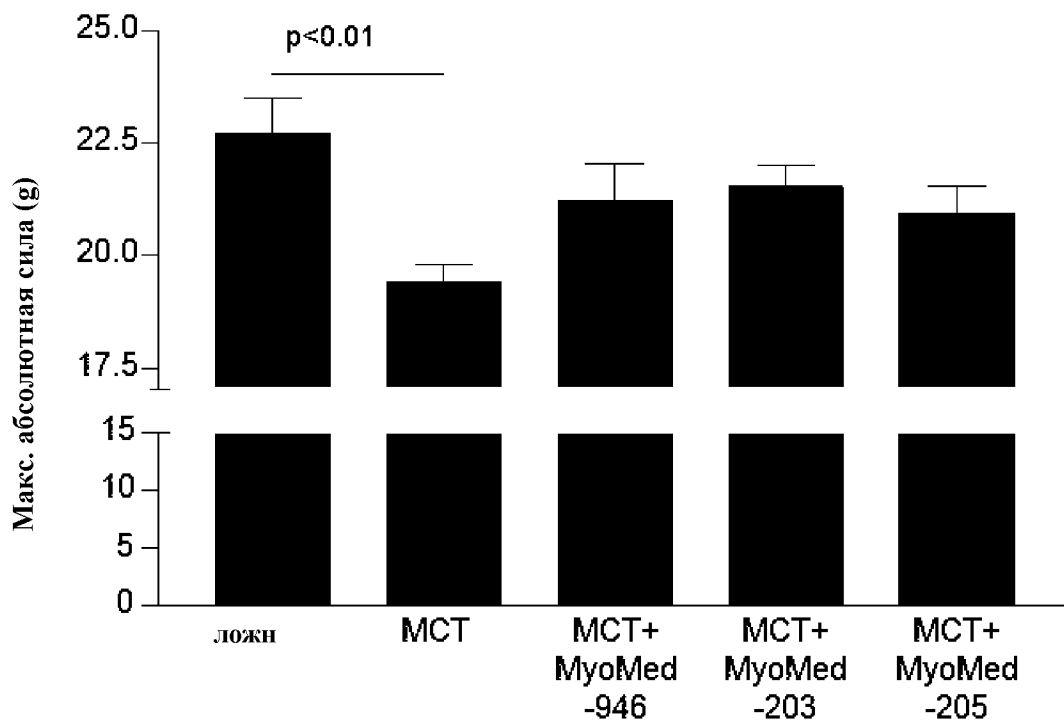
ФИГУРА 19



ФИГУРА 20

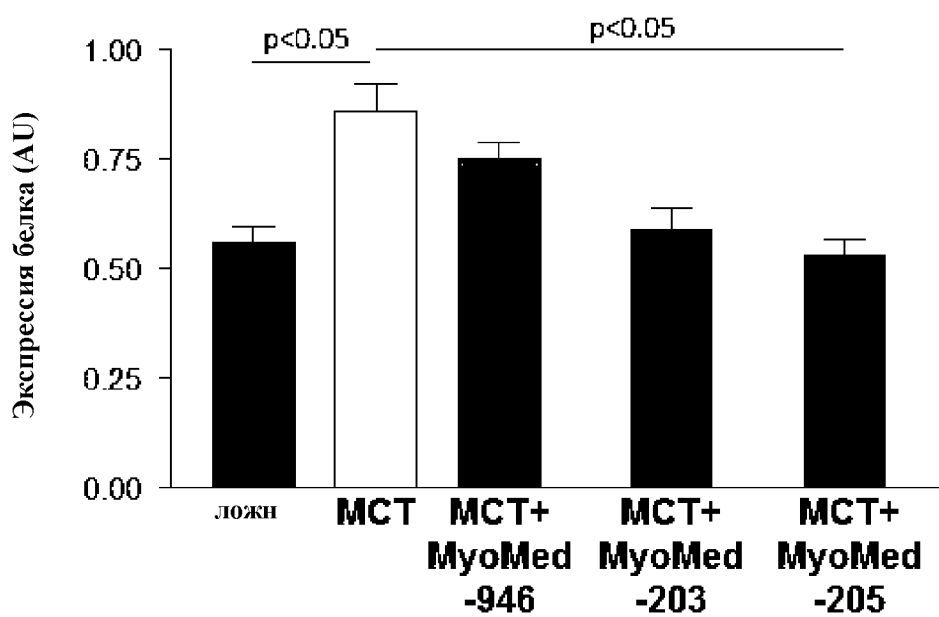


ФИГУРА 21

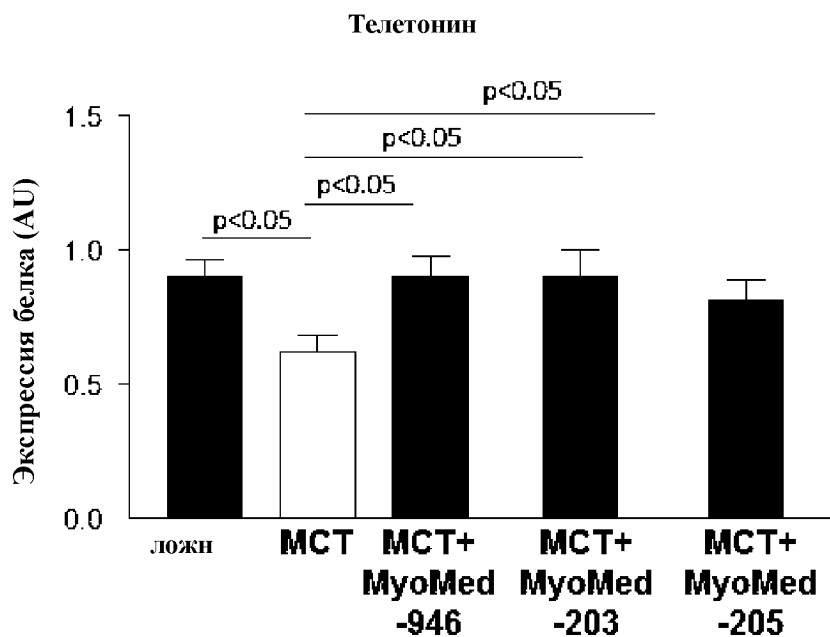


ФИГУРА 22

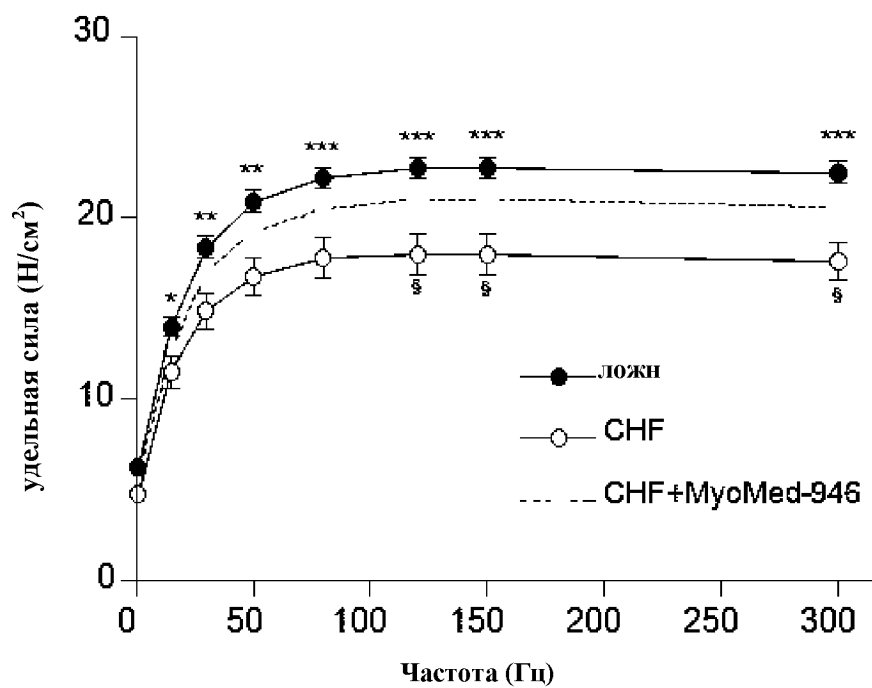
## MuRF1



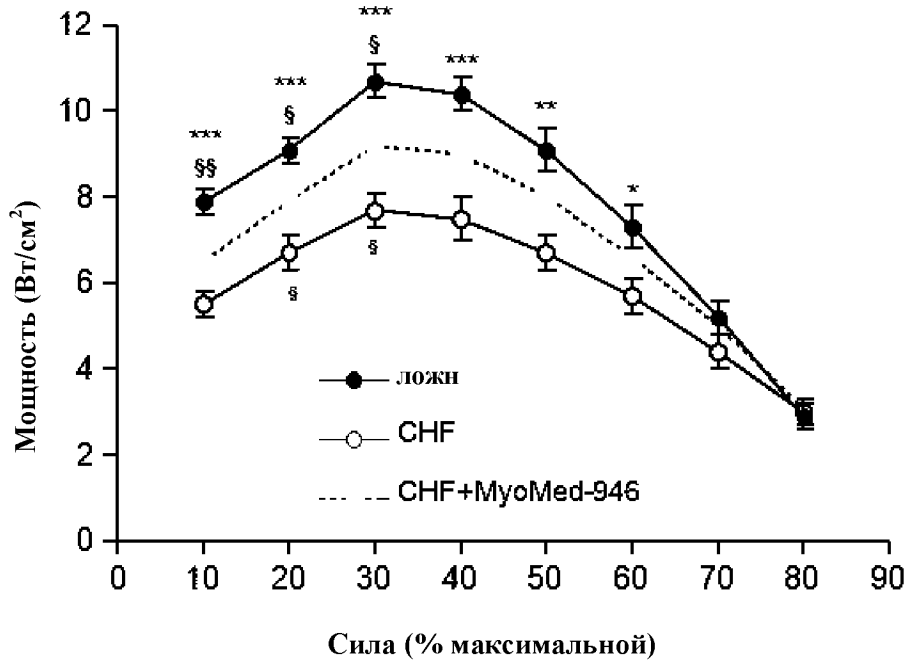
ФИГУРА 23



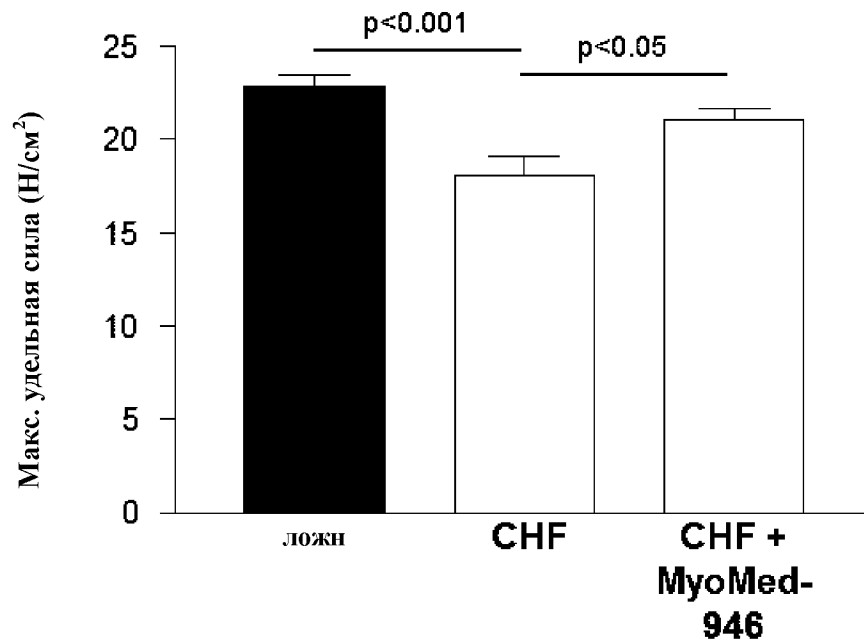
ФИГУРА 24



ФИГУРА 25

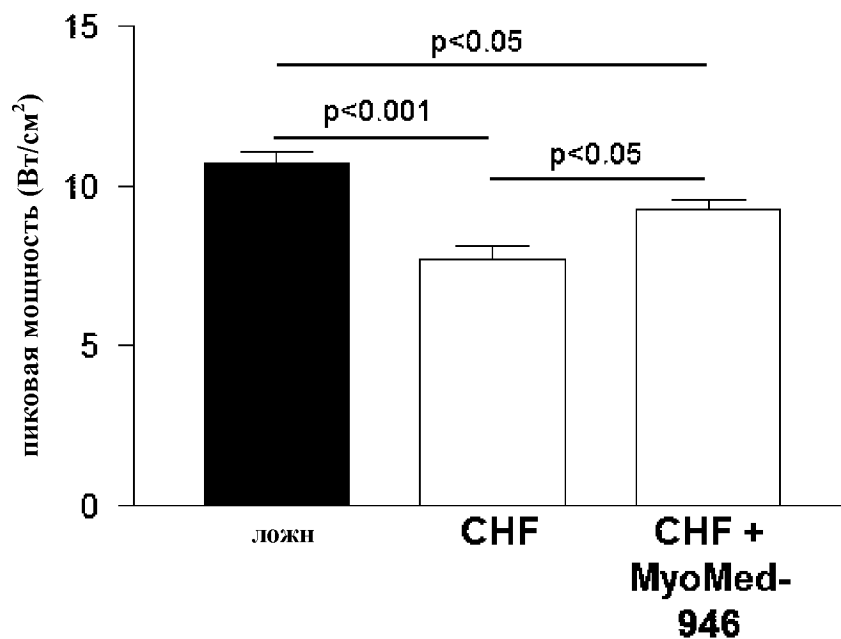


ФИГУРА 26

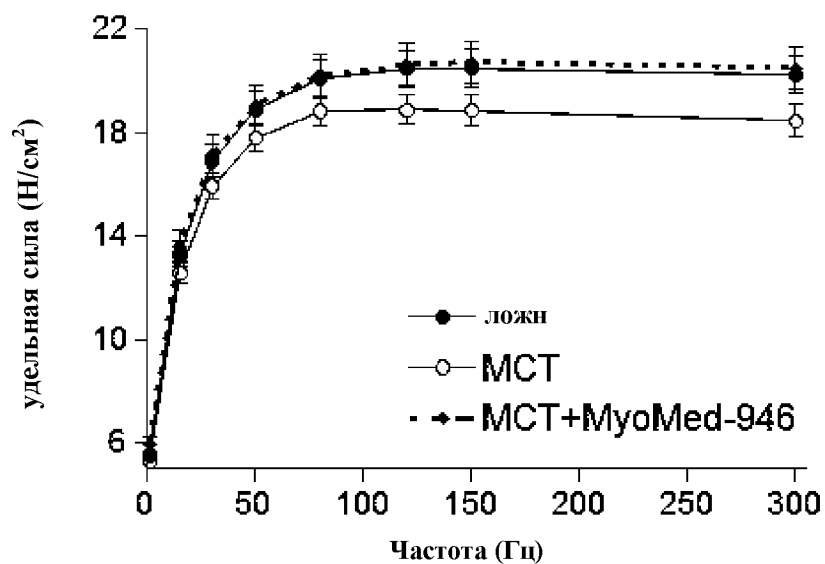




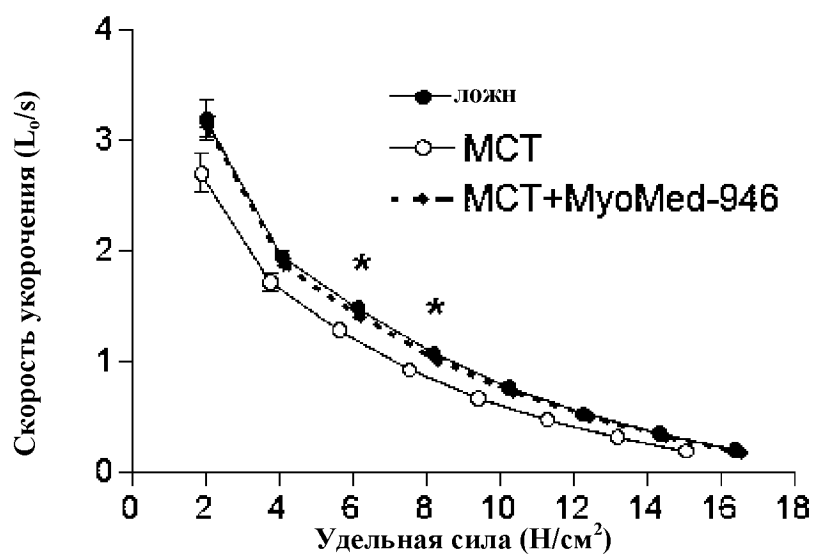
ФИГУРА 27



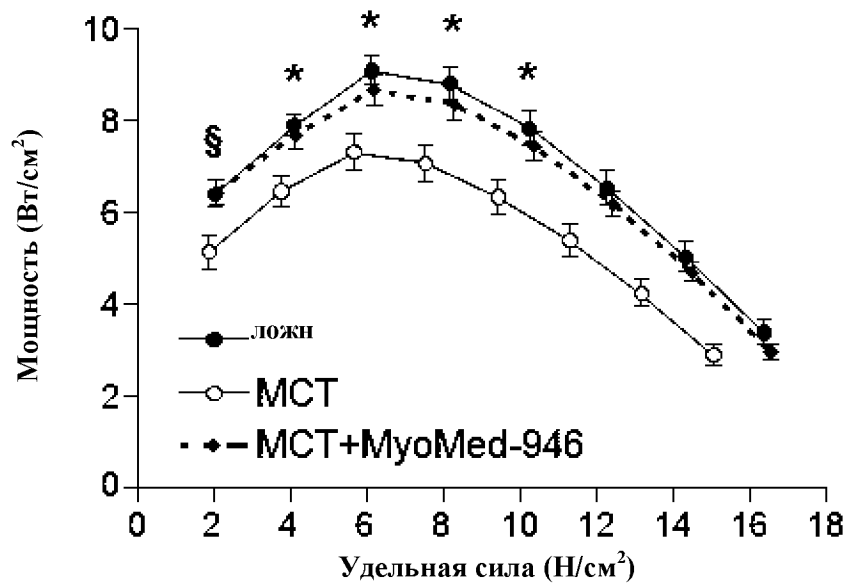
ФИГУРА 28



ФИГУРА 29

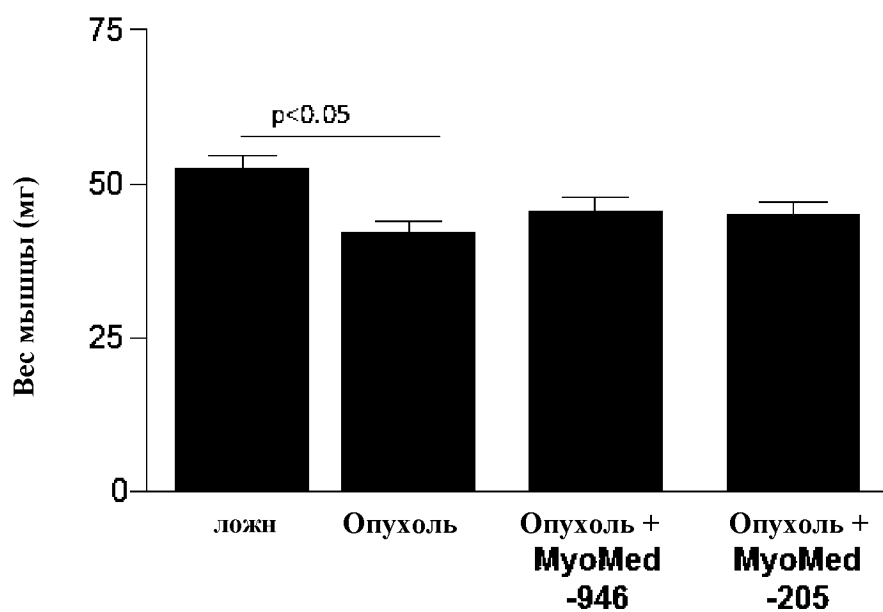


ФИГУРА 30

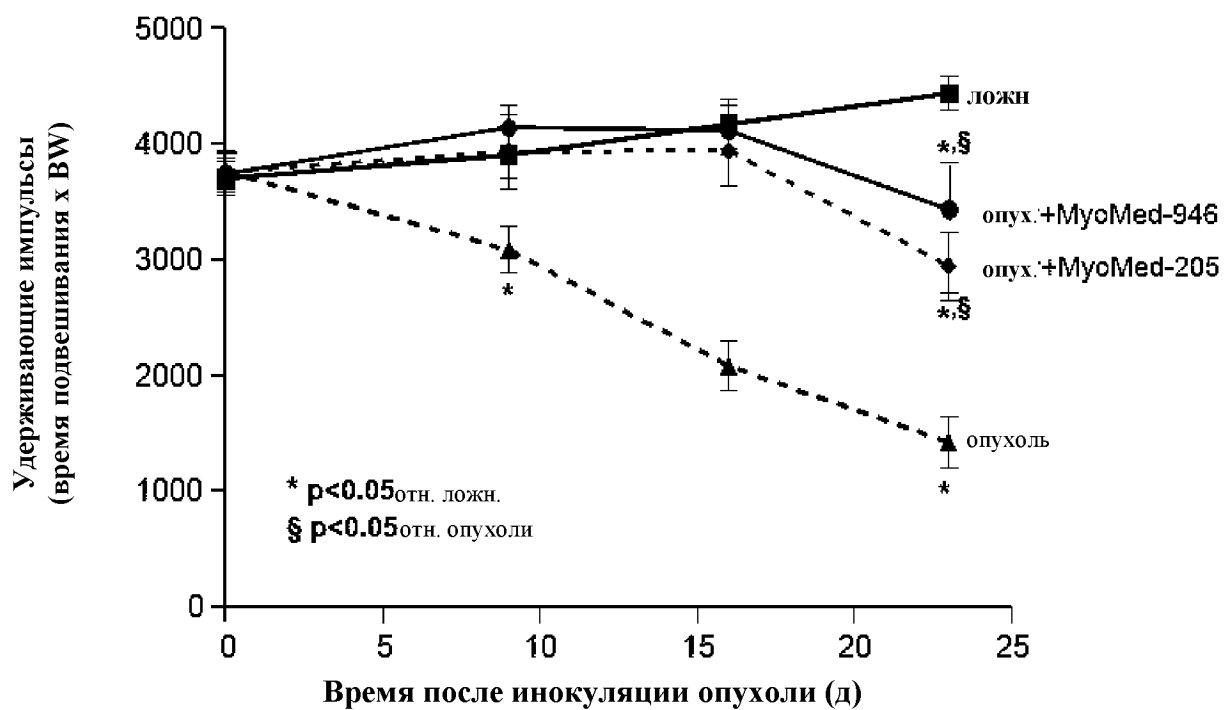


ФИГУРА 31

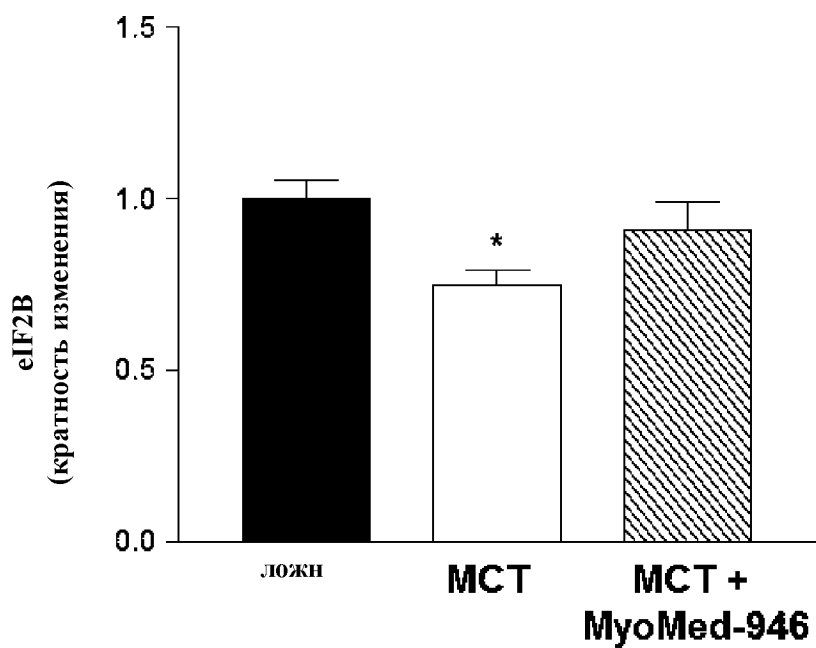
Вес мышцы ТА (левой)



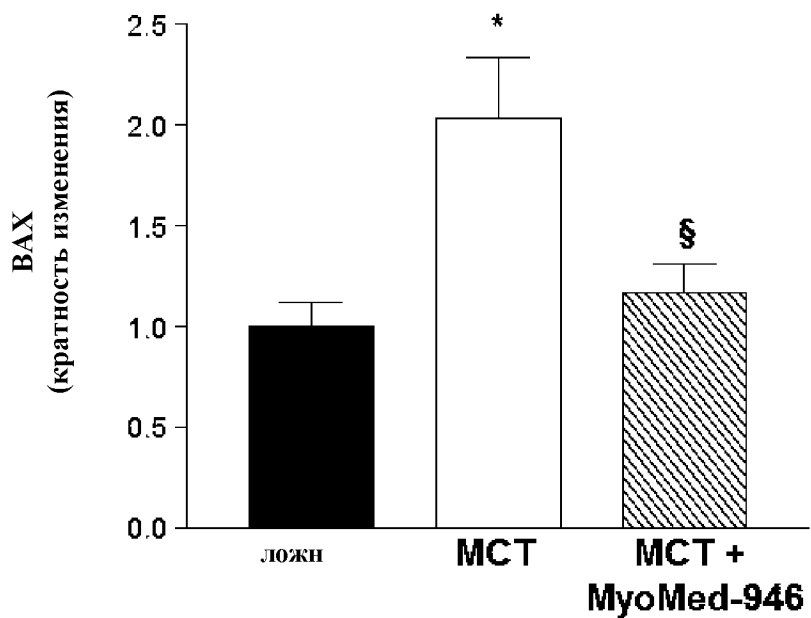
ФИГУРА 32



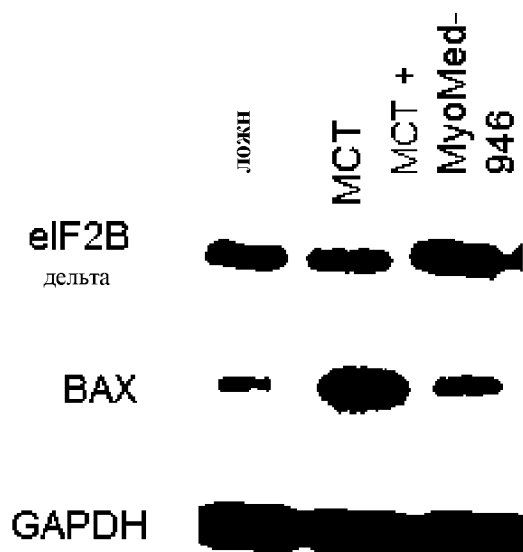
ФИГУРА 33



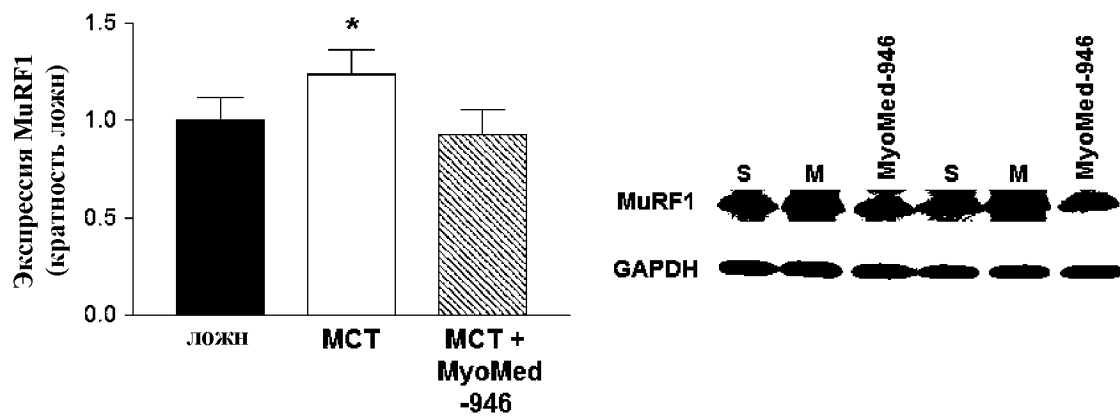
ФИГУРА 34



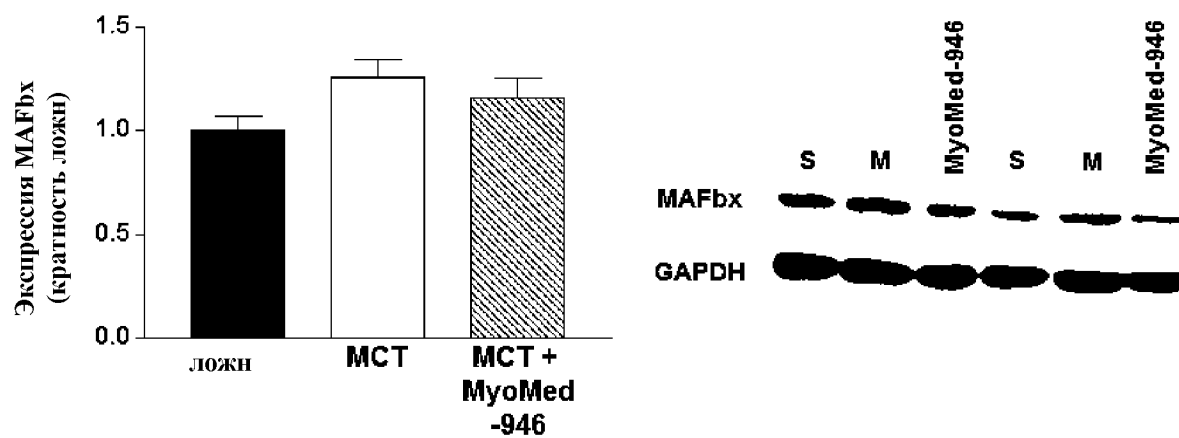
ФИГУРА 35



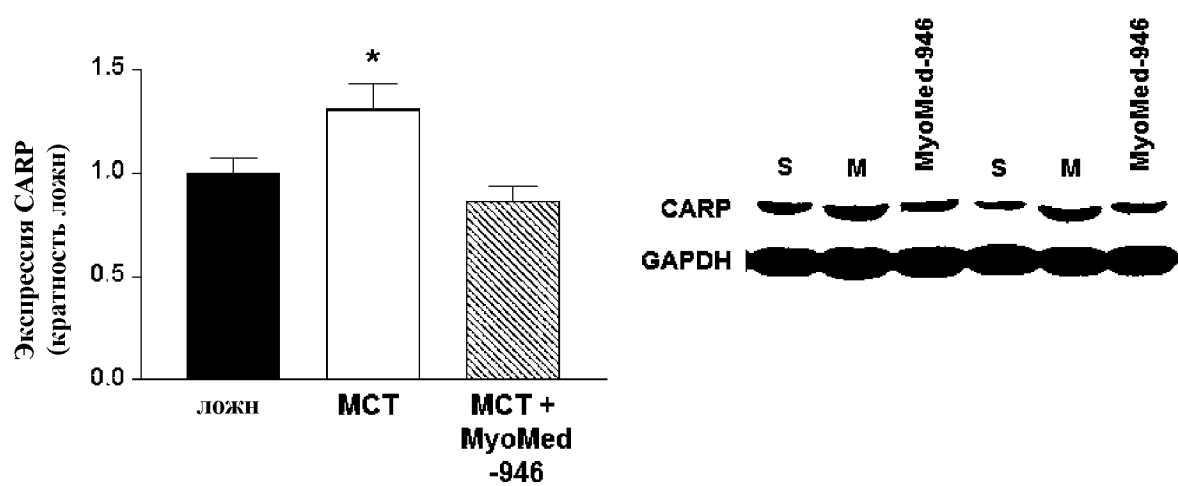
ФИГУРА 36



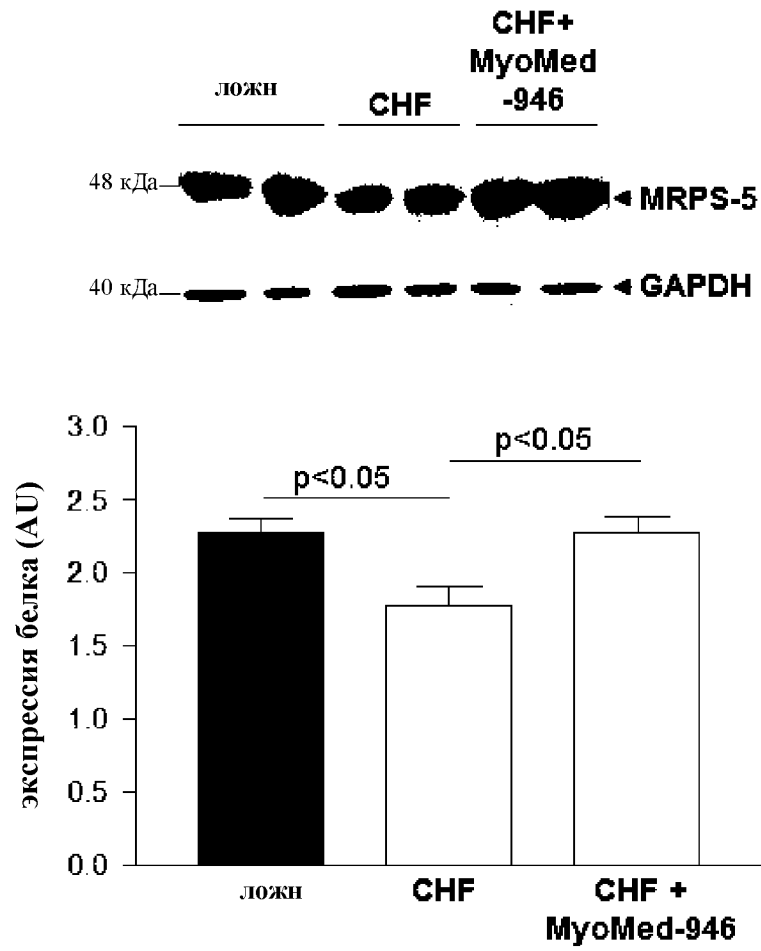
ФИГУРА 37



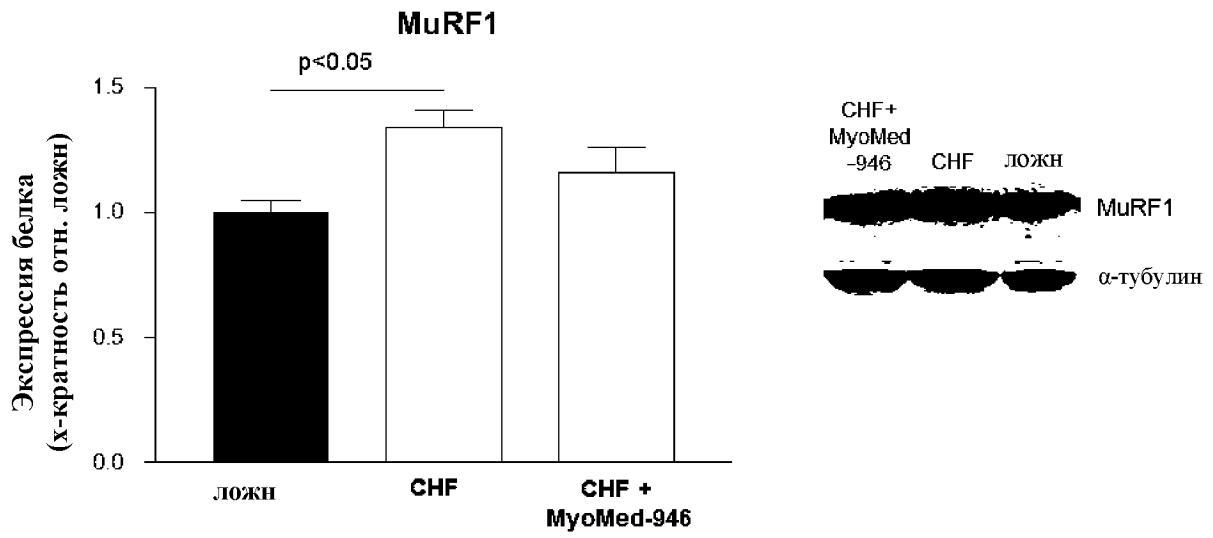
ФИГУРА 38



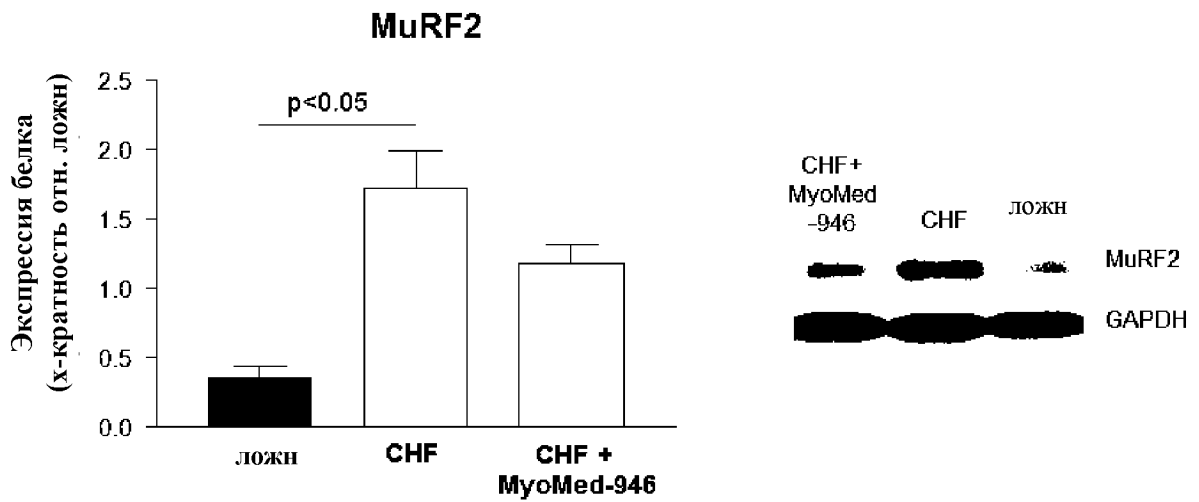
ФИГУРА 39



ФИГУРА 40

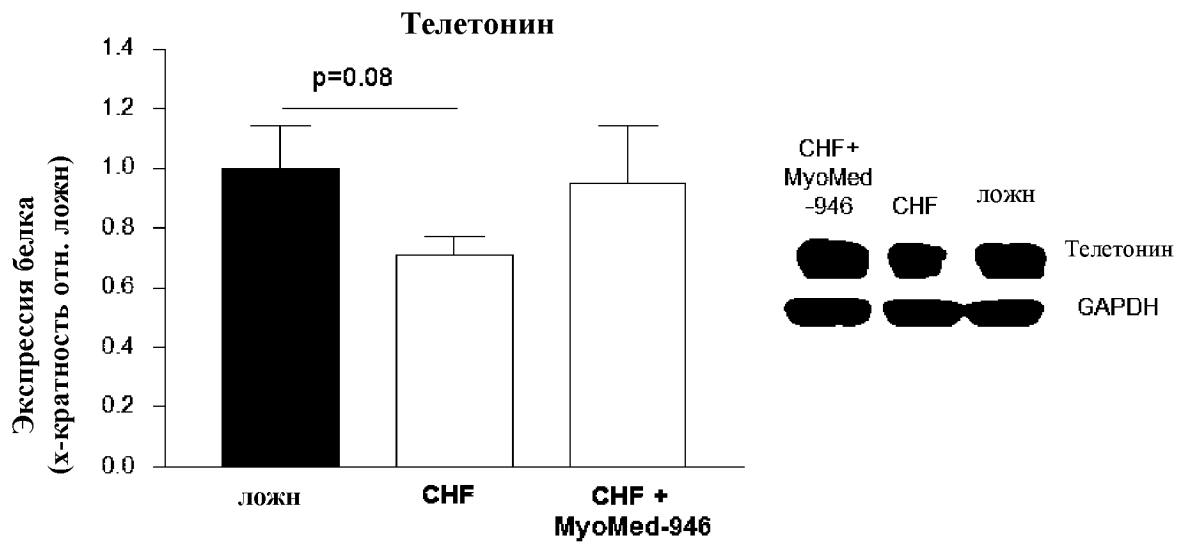


ФИГУРА 41

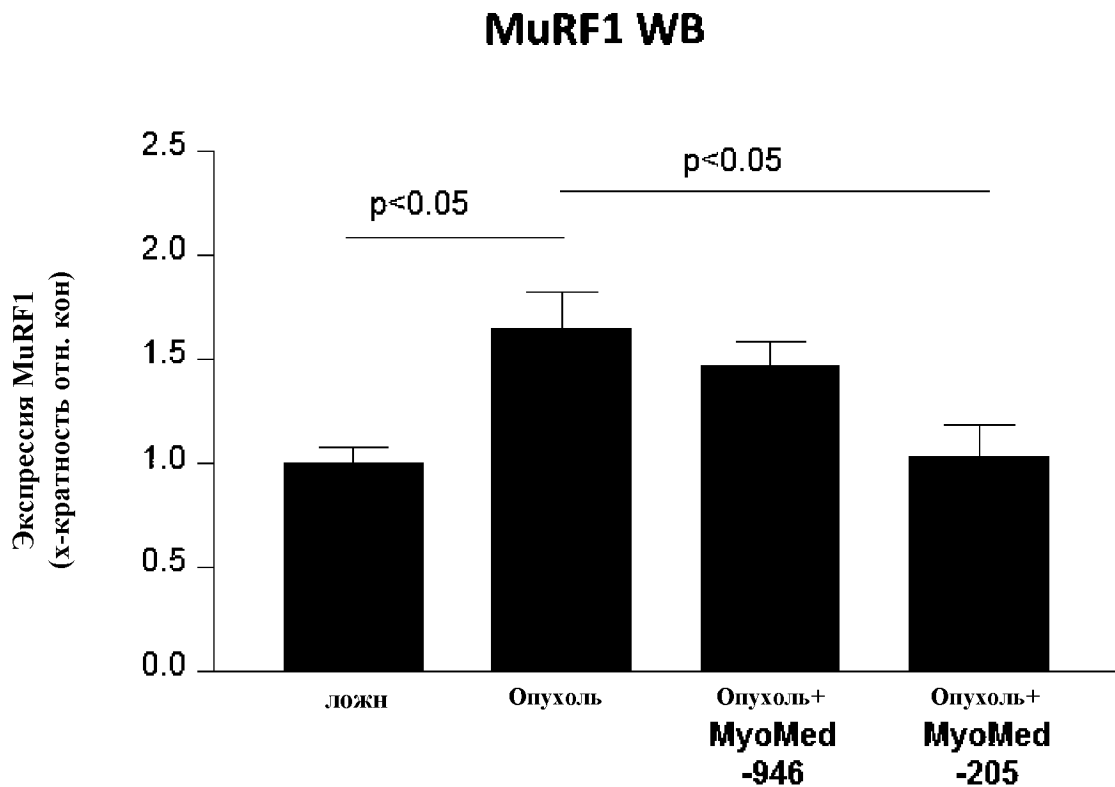




ФИГУРА 42

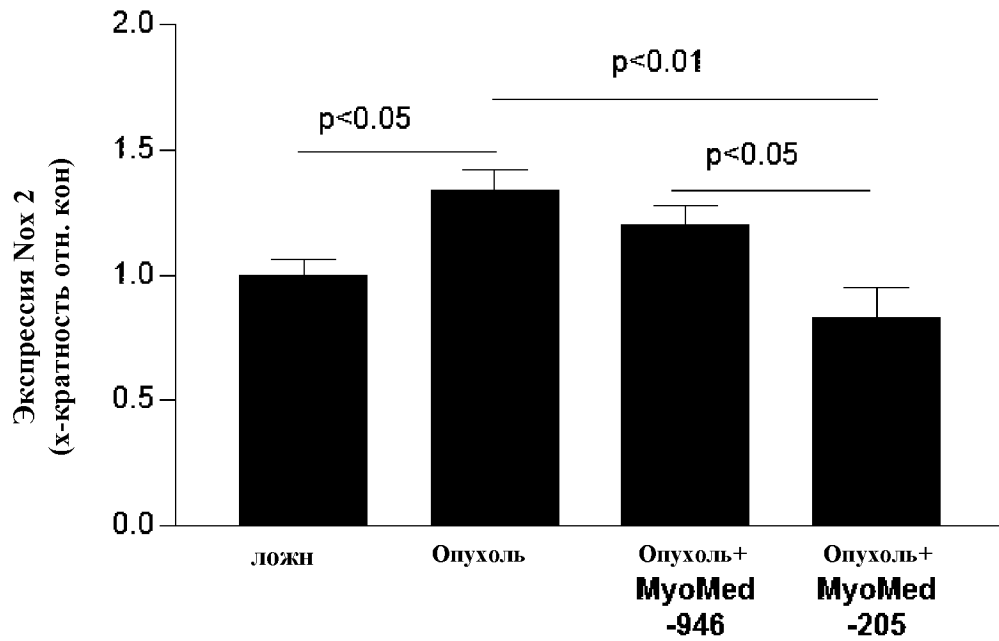


ФИГУРА 43



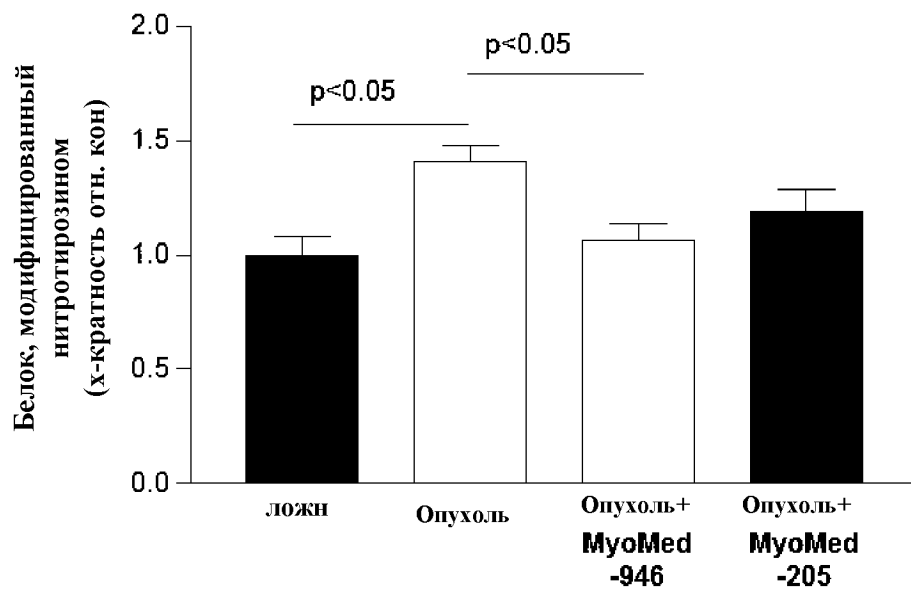
ФИГУРА 44

## Nox 2



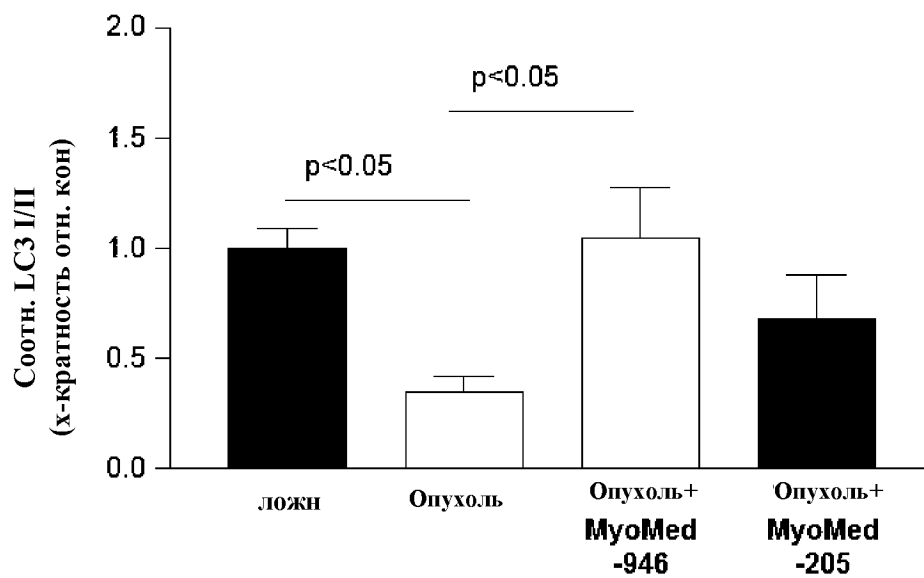
ФИГУРА 45

## Нитротирозин



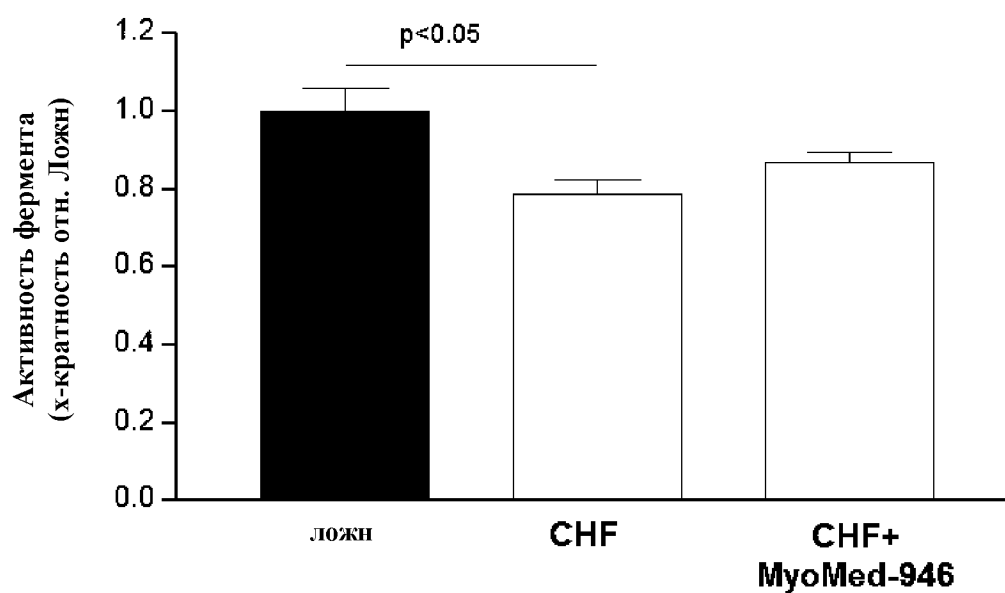
ФИГУРА 46

## LC3 I/II



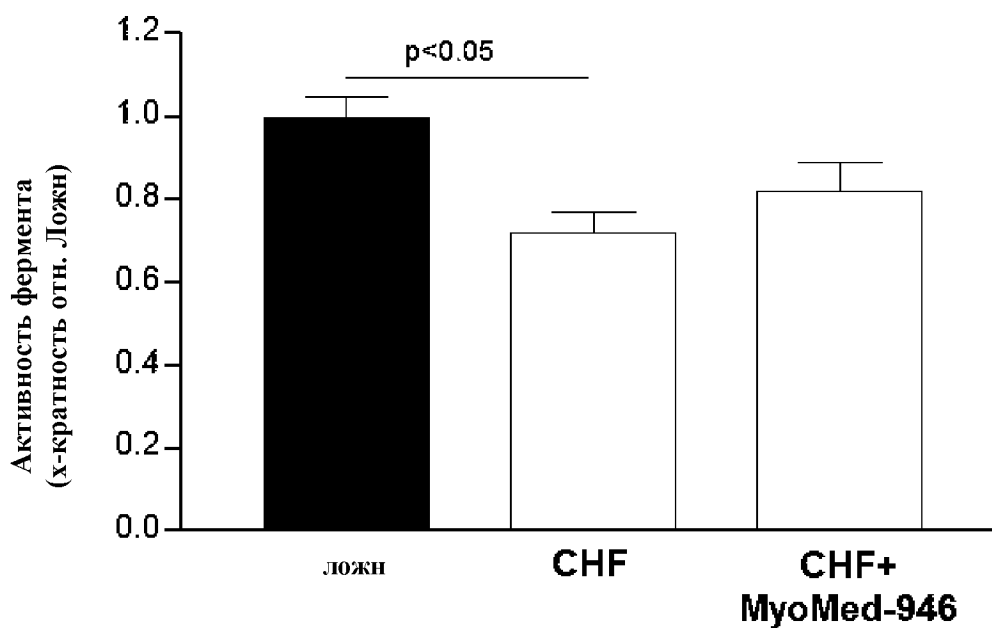
ФИГУРА 47

## Цитратсинтаза



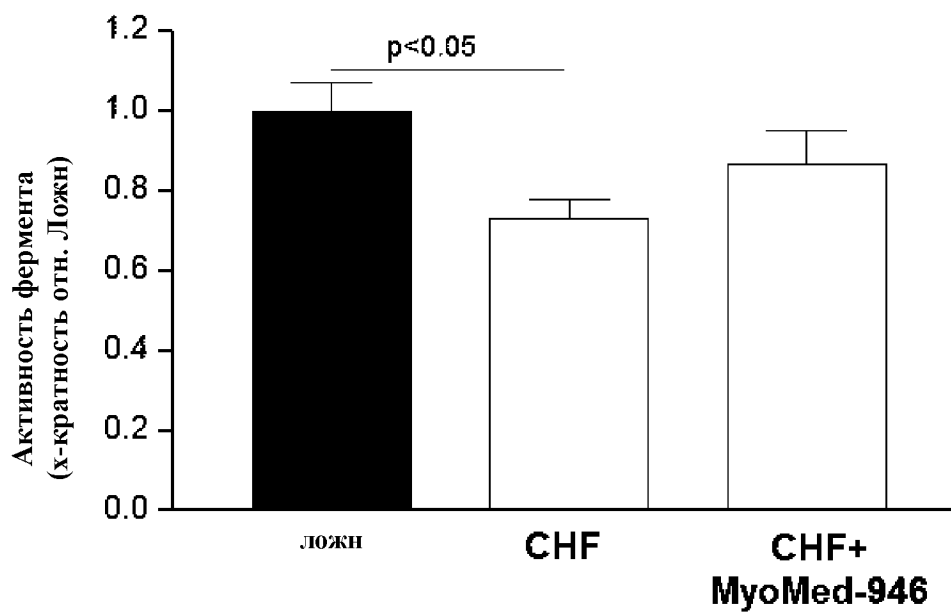
ФИГУРА 48

## Сукцинатдегидрогеназа

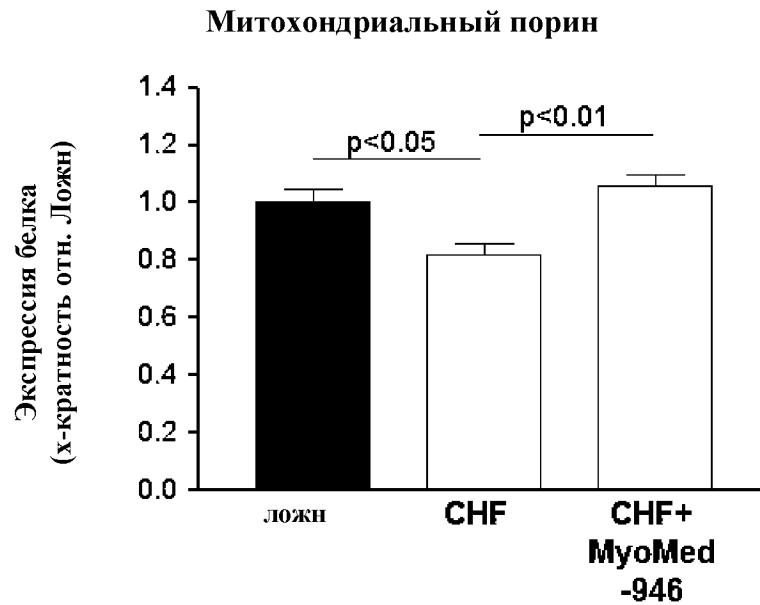


ФИГУРА 49

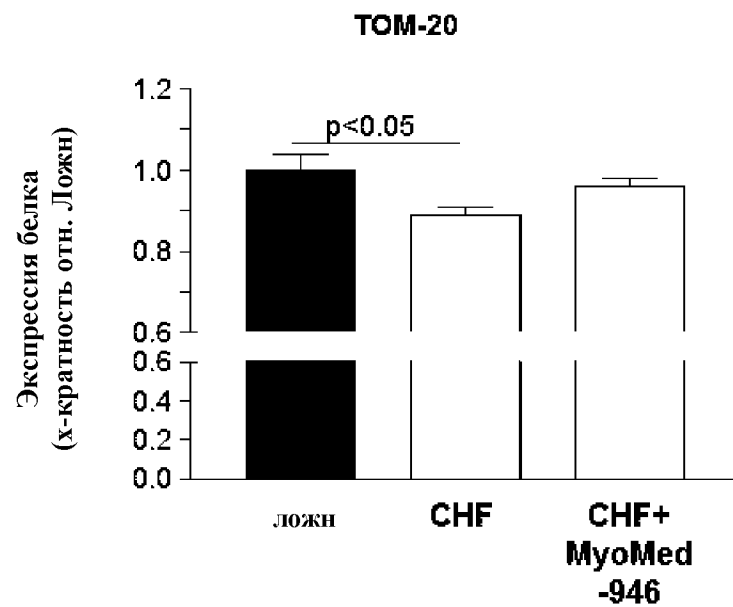
## Митохондриальный комплекс I



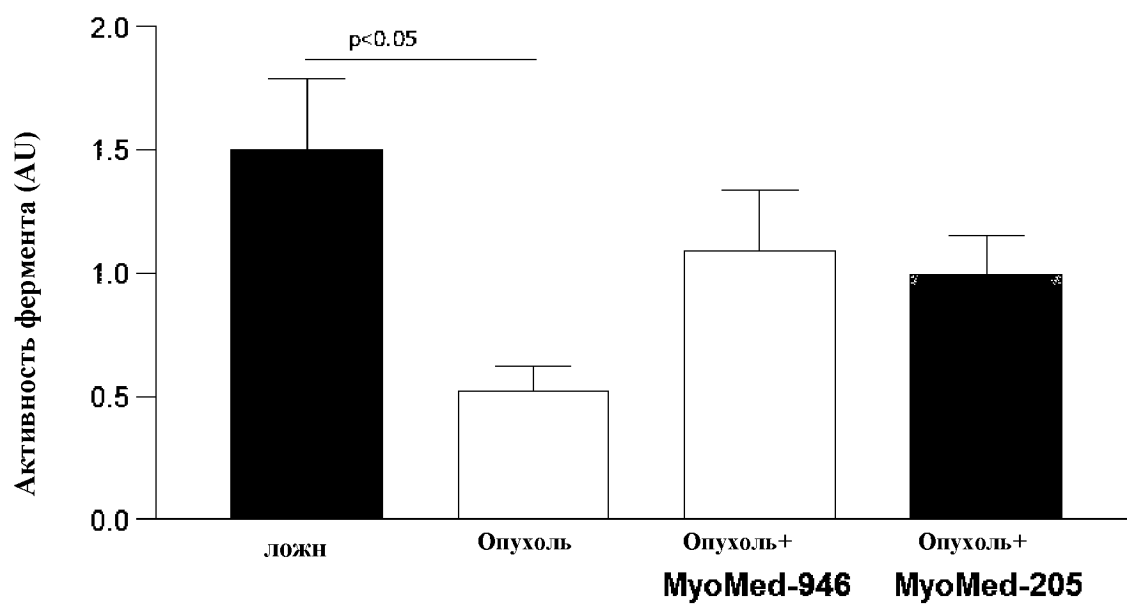
ФИГУРА 50



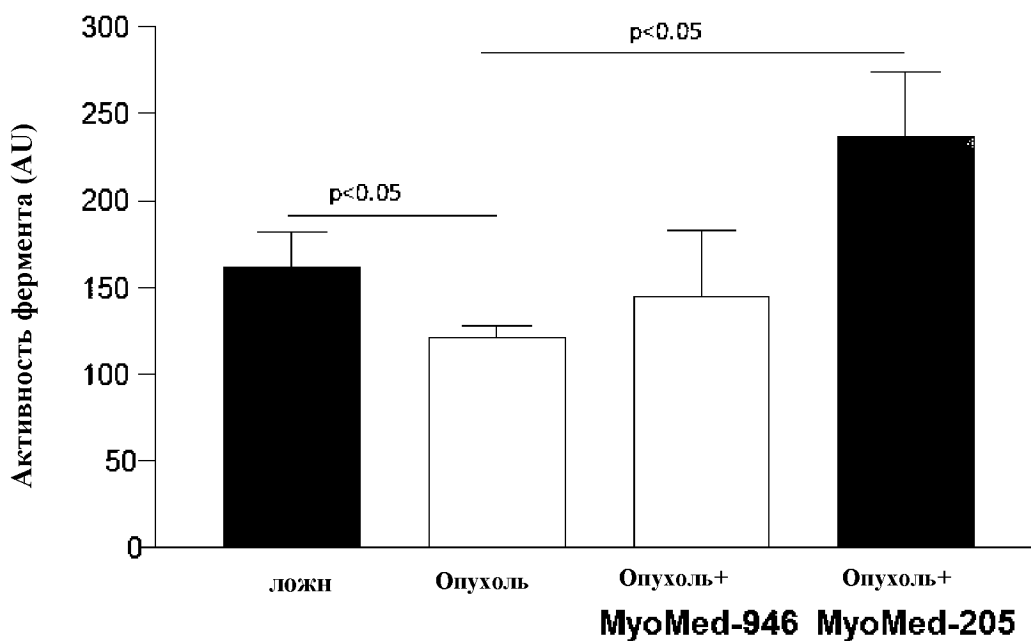
ФИГУРА 51



ФИГУРА 52

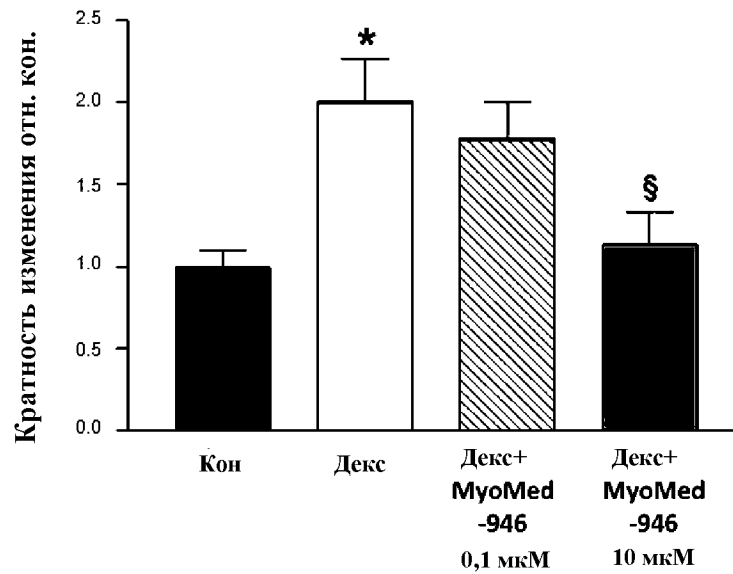
*Цитратсинтаза*

ФИГУРА 53

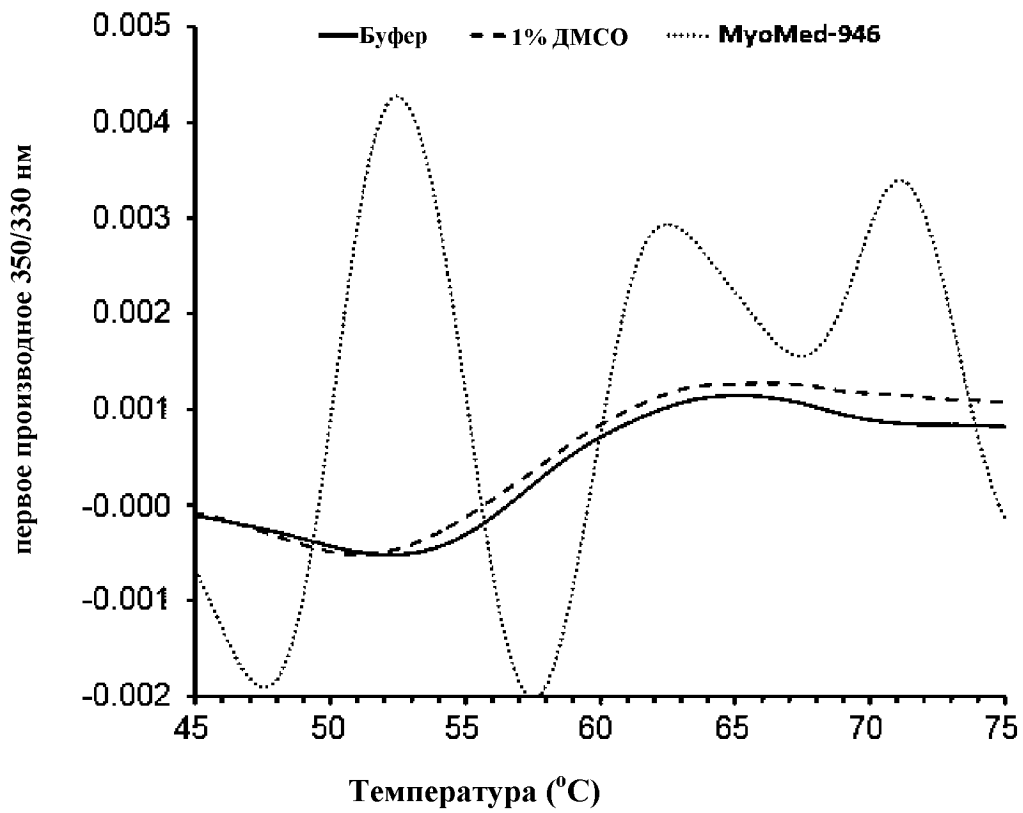
*Митохондриальный комплекс I*

ФИГУРА 54

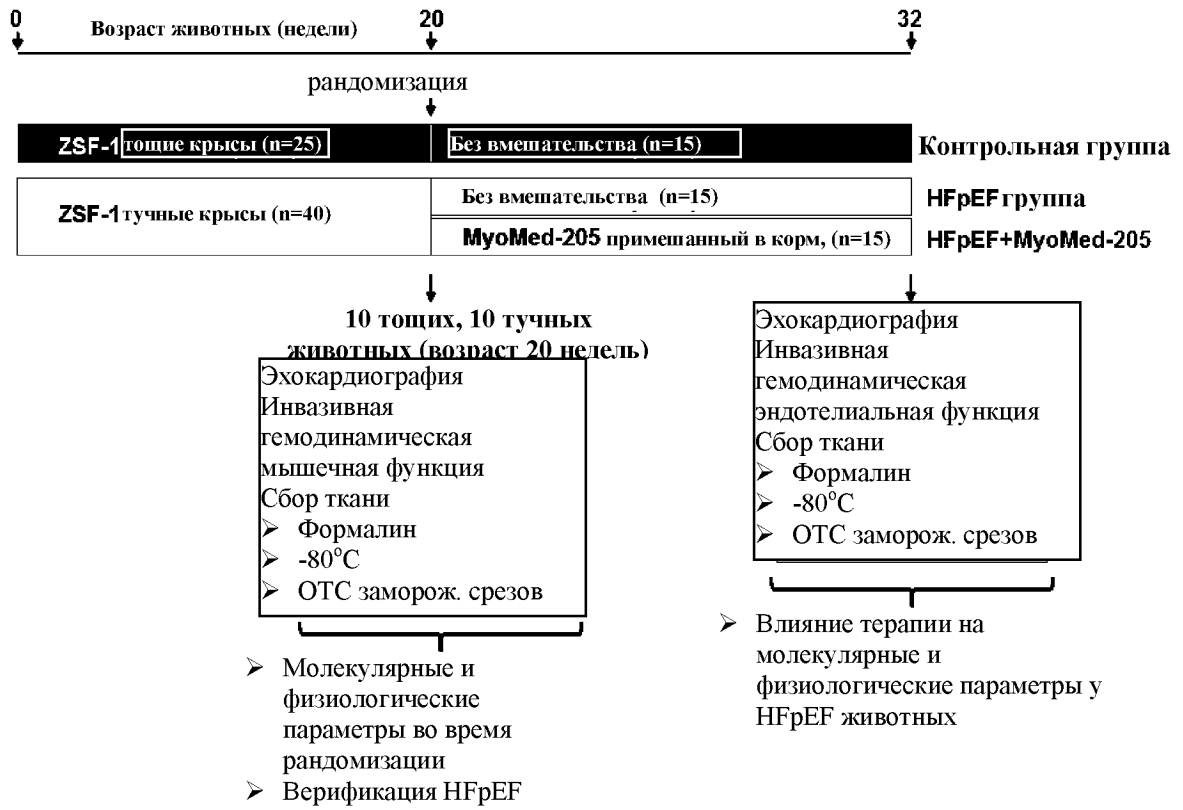
## Экспрессия мРНК MuRF1



ФИГУРА 55

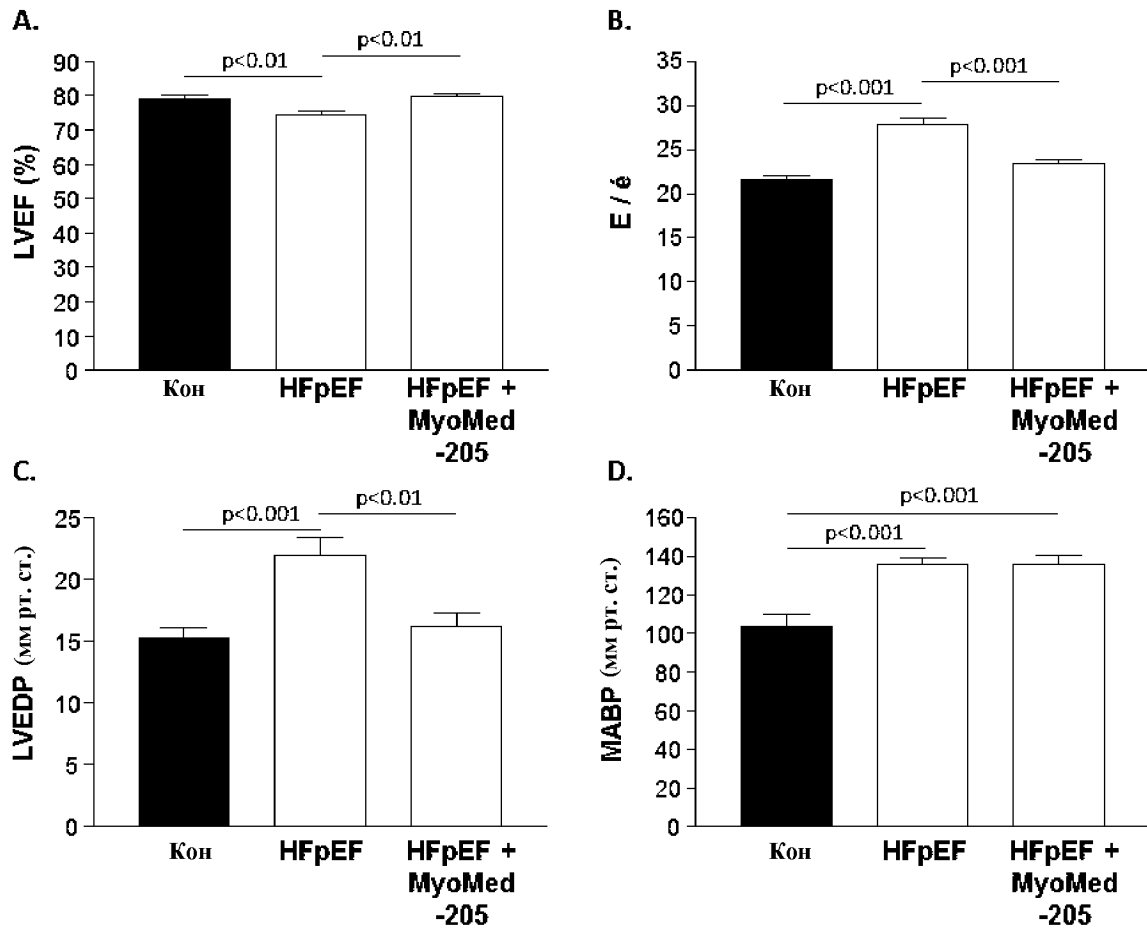


ФИГУРА 56

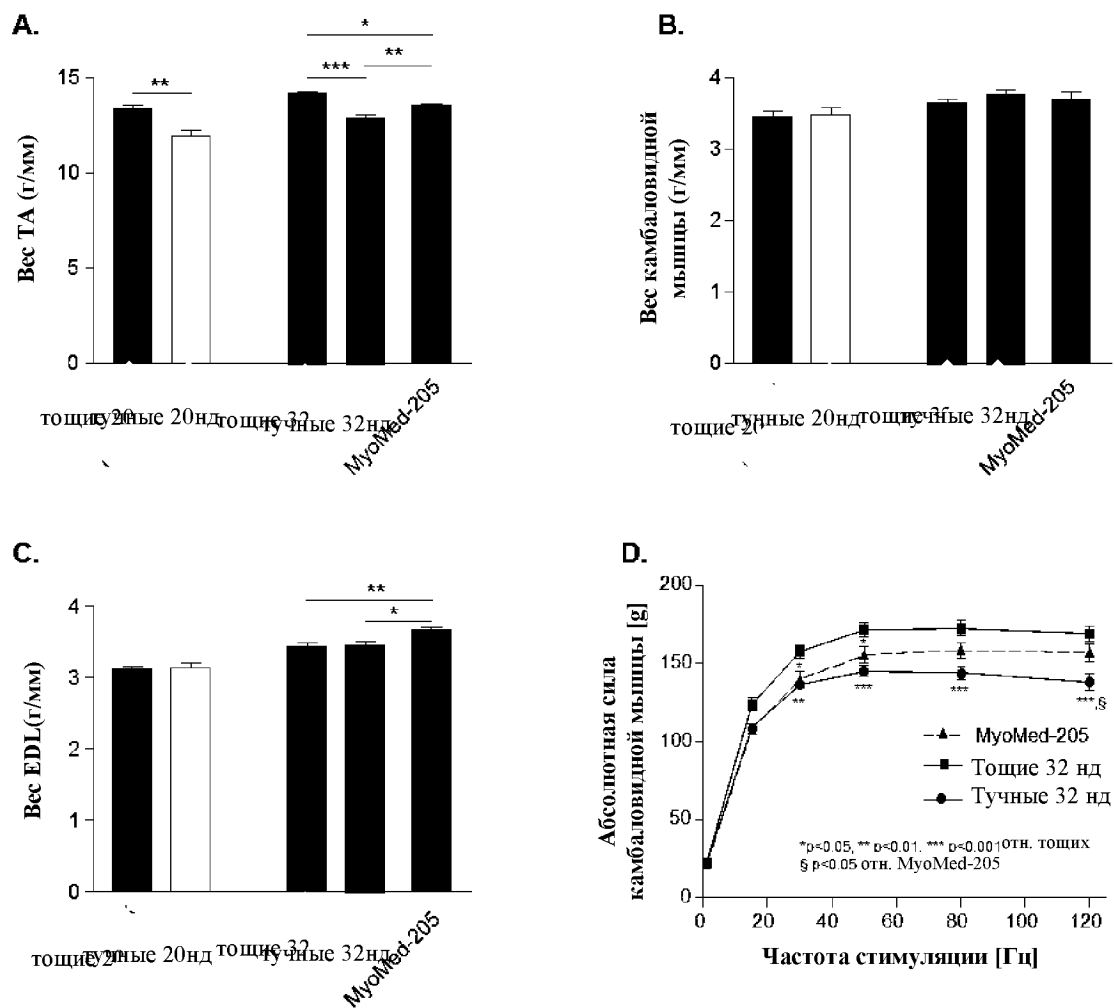




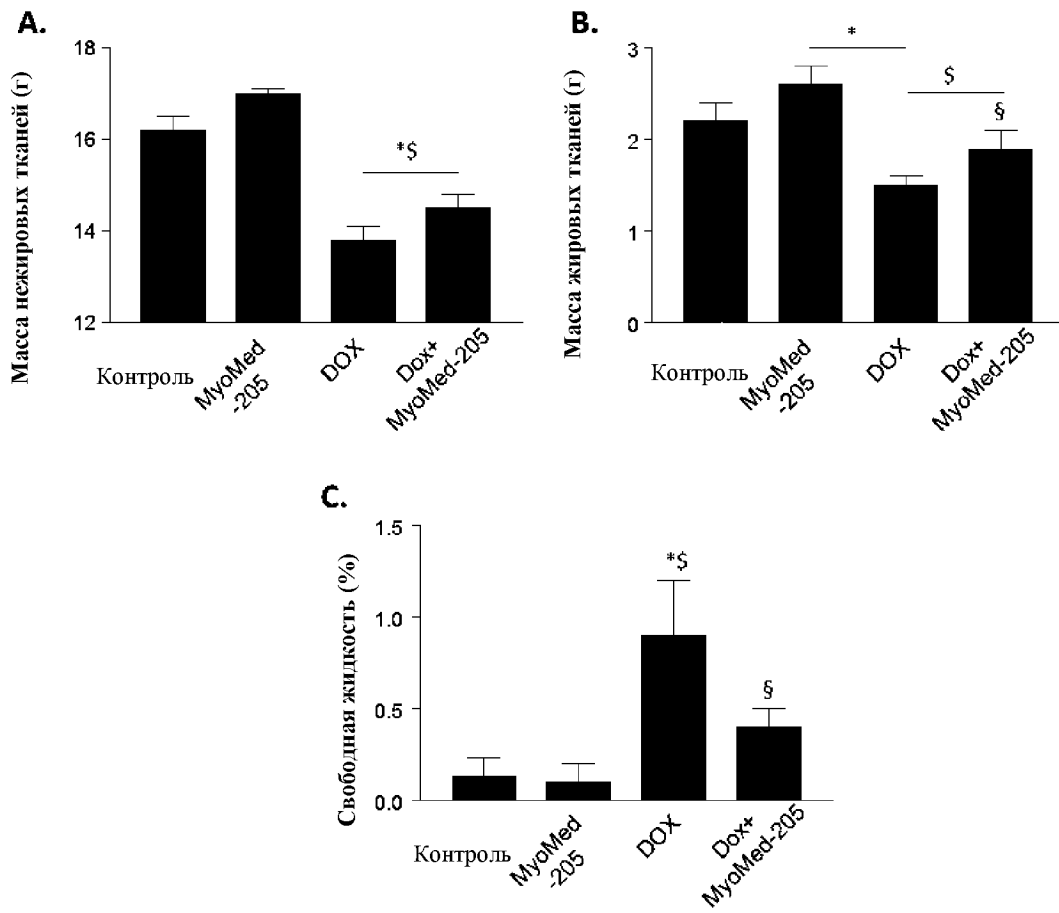
ФИГУРА 57



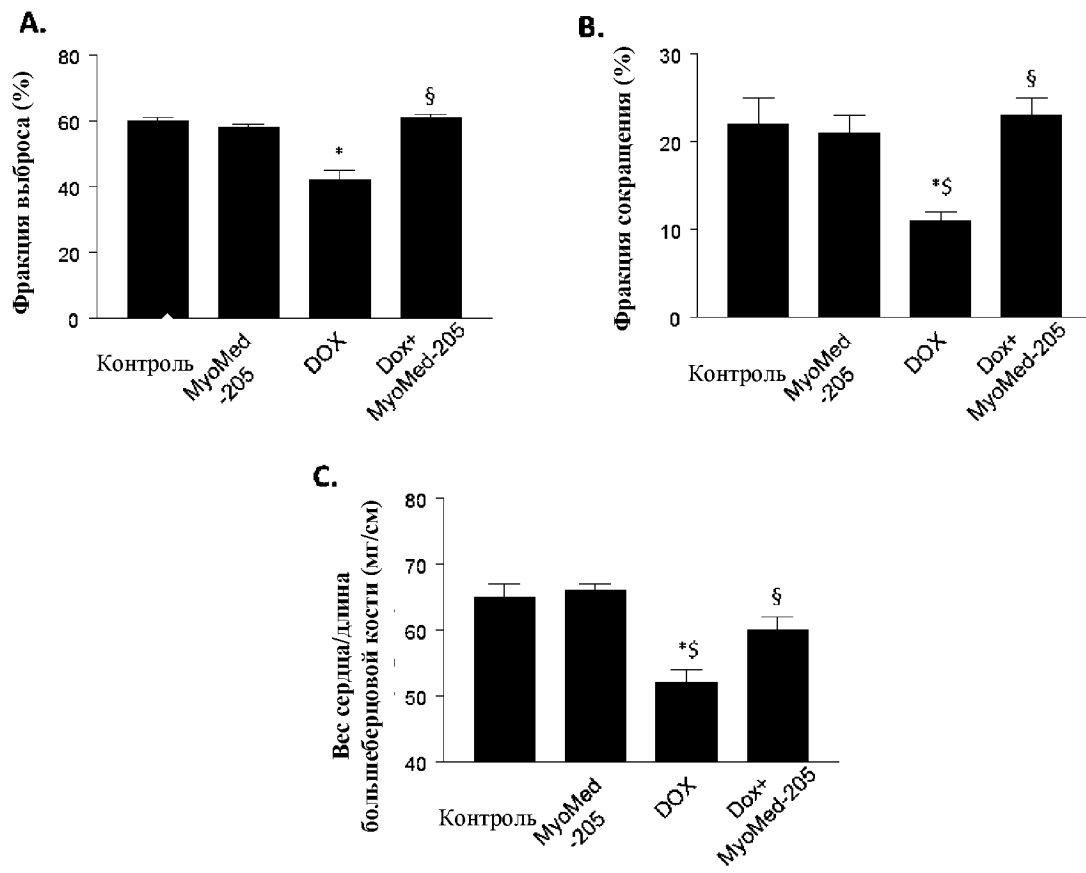
ФИГУРА 58



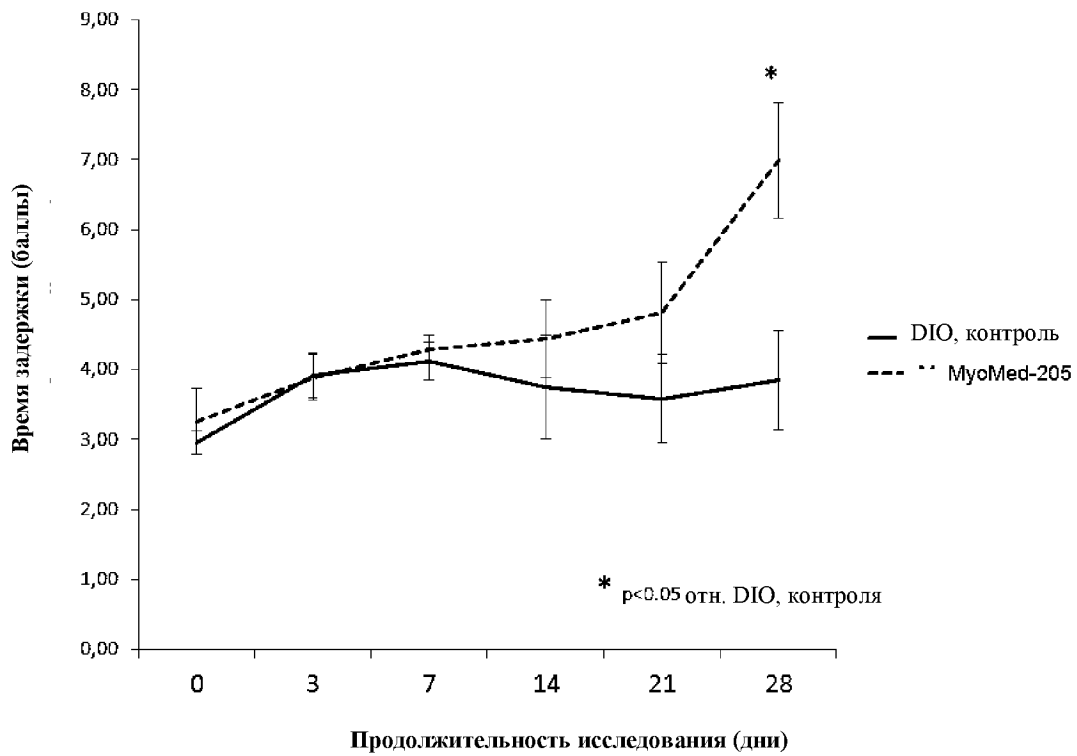
ФИГУРА 59



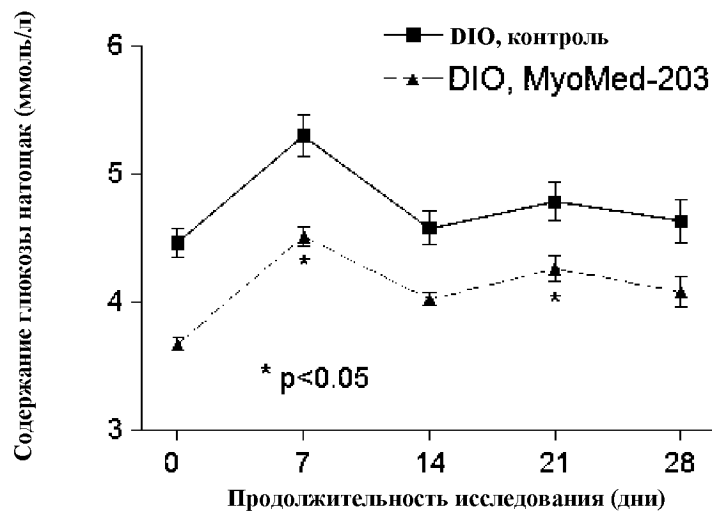
ФИГУРА 60



ФИГУРА 61

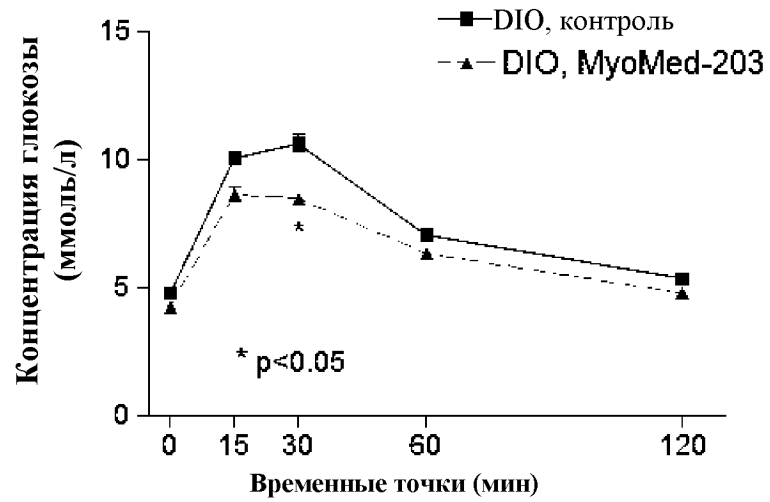


ФИГУРА 62



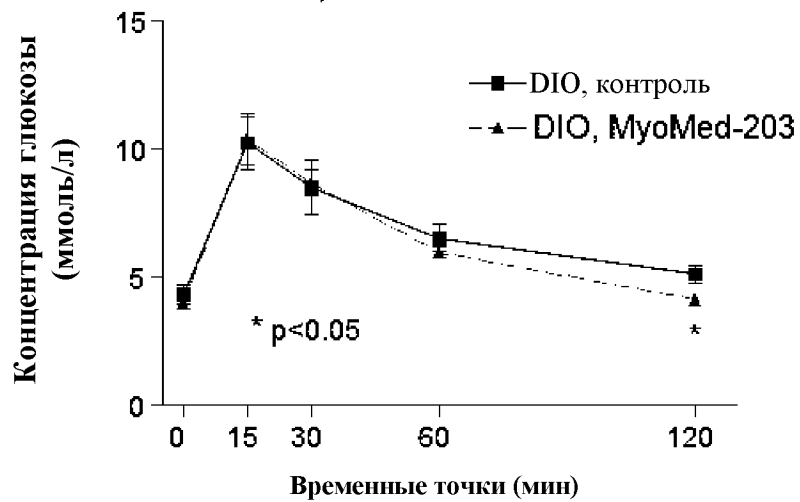
Фигура 63

## OGTT, 14 дней лечения



ФИГУРА 64

## OGTT, 28 дней лечения



ФИГУРА 65

