

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045397**(13) **B1**

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

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

**2023.11.22**

**(21)** Номер заявки

**202190005**

**(22)** Дата подачи заявки

**2019.07.02**

**(51)** Int.Cl. *C07D 213/64* (2006.01) *A61K 31/506* (2006.01)  
*C07D 213/65* (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)  
*C07D 213/68* (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)  
*C07D 213/69* (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)  
*C07D 401/14* (2006.01) *A61P 1/00* (2006.01)  
*C07D 213/73* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)  
*C07D 213/46* (2006.01) *A61P 1/06* (2006.01)  
*C07D 213/70* (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)  
*C07C 43/164* (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)  
*C07C 15/12* (2006.01) *A61P 17/06* (2006.01)  
*A61K 31/4402* (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)  
*A61K 31/4406* (2006.01) *A61P 31/12* (2006.01)  
*A61K 31/4409* (2006.01) *A61P 31/16* (2006.01)  
*A61K 31/444* (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)

**(54) ПРОИЗВОДНЫЕ 1,3,5-ТРИС(6-МЕТИЛПИРИДИН-2-ИЛОКСИ)БЕНЗОЛА И РОДСТВЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ ЛИГАНДОВ NLRX1 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

**(31)** 62/694,076; 16/270,350

**(32)** 2018.07.05; 2019.02.07

**(33)** US

**(43)** 2021.05.14

**(86)** PCT/US2019/040386

**(87)** WO 2020/010132 2020.01.09

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:

**ЛЭНДОС БАЙОФАРМА, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:

**Бэссэйгэйнния-Риэра Джозеп, Лебер  
Эндрю, Хонтэсиллэс Ракель (US)**

**(74)** Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** JP-A-2017171603

CN-A-107789677

CN-A-103374025

JP-A-2001354639

ANDREAS SCHMIDT ET AL.: "Synthesis of Functionalized Pyridines by Substitution of Heteronitrogen-Activated? Pentachloropyridine with Bisnucleophiles", SYNTHESES, vol. 2006, № 23, 2 November 2006

(2006-11-02), - December 2006 (2006-12), p. 3987-3996, XP055412472, STUTTGART, DE, ISSN: 0039-7881, DOI: 10.1055/s-2006-950338, p. 3991, compound 18

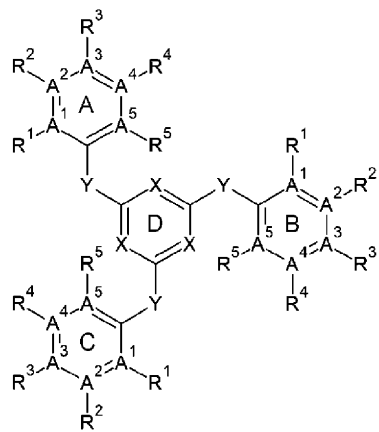
PINYI LU ET AL.: "Modeling-Enabled Characterization of Novel NLRX1 Ligands", PLOS ONE, vol. 10, № 12, 29 December 2015 (2015-12-29), p. e0145420, XP55618031, DOI: 10.1371/journal.pone.0145420, abstract, p. 8-10; fig. 1-3, compounds

MOHAMED A. MOTALEB ET AL.: "Radioiodination and biological distribution of a new s-triazine derivative for tumor uptake evaluation", JOURNAL OF LABELLED COMPOUNDS AND RADIOPHARMACEUTICALS, vol. 61, № 14, 7 September 2018 (2018-09-07), - December 2018 (2018-12), p. 1058-1068, XP055617830, GB, ISSN: 0362-4803, DOI: 10.1002/jlcr.3682, abstract, p. 1059, fig. 4, 5, compounds 1, 2; p. 1064, table 2, compounds 1, 2

AL-KHODIR FATIMA A.I. ET AL.: "Synthesis, chemical and biological investigations of new Ru(III) and Se(IV) complexes containing 1,3,5-triazine chelating derivatives", JOURNAL OF MOLECULAR STRUCTURE, vol. 1179, 24 November 2018 (2018-11-24), - 5 March 2019 (2019-03-05), p. 795-808, XP085561796, ISSN: 0022-2860, DOI: 10.1016/J.MOLSTRUC.2018.11.082, abstract, p. 796, fig. 1, compound L1; p. 797, scheme 1; p. 805-806, fig. 8, 9, tab. 6, 7

**(57)** Предложены производные 1,3,5-трис(6-метилпиридин-2-илокси)бензола и родственные соединения, которые нацелены на путь нуклеотидсвязывающего домена олигомеризации X1, содержащего богатый лейцином повтор (NLRX1). Указанные соединения можно применять для лечения множества состояний, включая воспалительные заболевания желудочно-кишечного тракта и злокачественные новообразования.

**B1****045397****045397****B1**



Формула Z

### Область техники

Данное изобретение относится к лигандам NLRX1 и их применениям, таким как лечение и предупреждение злокачественных новообразований и воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта, таких как воспалительные заболевания кишечника.

### Уровень техники

Нуклеотидсвязывающий домен олигомеризации X1, содержащий богатый лейцином повтор (NLRX1) (также называемый как "NOD-подобный рецептор X1", или "член X1 семейства NLR", или "NOD9"), представляет собой белок сигнального пути, который экспрессируется в иммунных клетках, желудочно-кишечном тракте, а также в коже, легких, мышцах, эндокринных и репродуктивных тканях [1]. Молекула NLRX1 имеет три различных домена и располагается в митохондриях [2]. Опубликованные результаты показывают, что потеря NLRX1 ухудшает тяжесть заболевания и изменяет метаболизм иммунных клеток [3] в моделях воспалительного заболевания кишечника [4-6]. Белок NLRX1 также участвует в моделях вирусных ответов [7-14], бактериальной инфекции [15], грибковой инфекции [16], рака [17-21], стеатоза печени [22, 23], диабета 2 типа [24], травмы головного мозга [25], ишемии миокарда [26], хронической обструктивной болезни легких [27] и аутоиммунного энцефаломиелита [28].

Существуют очевидные неудовлетворенные клинические потребности в безопасных и эффективных методах лечения заболеваний, в которых участвует NLRX1. К ним относятся аутоиммунные заболевания, хронические и воспалительные заболевания желудочно-кишечного тракта, такие как воспалительные заболевания кишечника, злокачественные новообразования и инфекционные заболевания. Из-за низкой эффективности и низкой безопасности современные методы лечения аутоиммунных заболеваний требуют частого мониторинга, смены парадигм лечения и сложных способов доставки. Таким образом, необходимы новые методы лечения, которые можно вводить перорально для длительного лечения болезни. При инфекционных заболеваниях высокая частота мутаций у различных микроорганизмов требует разработки новых неантимикробных методов лечения, не требующих использования антибактериальных, противогрибковых и противовирусных препаратов. Кроме того, новые штаммы и эпидемические инфекции создают период задержки между появлением патогена и доступностью специфических для микробов вмешательств, создавая потребность в новых терапевтических средствах, нацеленных на хозяина. Учитывая эпидемию инфекционных и аутоиммунных заболеваний в целом, путь NLRX1 может значительно повлиять на миллионы пациентов.

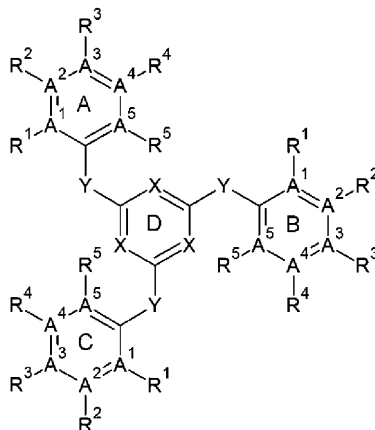
Вирусные нуклеиновые кислоты [29] и пищевые липиды были идентифицированы как естественные лиганды NLRX1 [5]. Существует потребность в разработке новых лигандов пути NLRX1, чтобы можно было адаптировать методы лечения к отдельным заболеваниям и потенциально максимизировать их эффективность.

Настоящее изобретение относится к соединениям, которые связываются с белком NLRX1 и, таким образом, вызывают положительный ответ при различных болезненных состояниях, включающих, но не ограничиваясь ими, воспалительные, иммуноопосредованные или хронические желудочно-кишечные заболевания, такие как воспалительные заболевания кишечника, системные иммуноопосредованные заболевания, злокачественные новообразования и инфекционные заболевания бактериального, грибкового и вирусного происхождения.

### Краткое описание сущности изобретения

Данное изобретение относится к соединениям формулы Z, имеющим кольцо A, кольцо B, кольцо C и кольцо D, или их фармацевтически приемлемым солям, где

Z представляет собой



X в каждом случае представляет собой CH;

Y в каждом случае независимо выбран из группы, включающей NR<sup>6</sup>, O, S, CH<sub>2</sub> и C=O, при условии, что Y между кольцом D и кольцом A представляет собой O;

A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, A<sup>4</sup> и A<sup>5</sup> в каждом случае независимо выбраны из группы, включающей N и C, при условии,

что каждый из  $A^1$ ,  $A^2$ ,  $A^3$  и  $A^4$  в кольце А представляет собой С и  $A^5$  в кольце А представляет собой N;

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  и  $R^6$ , когда они присутствуют, в каждом случае независимо выбраны из группы, включающей водород, гидроксид, амино и C1-C6 алкил, при условии, что любой из  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  и/или  $R^5$  в данном кольце отсутствует, когда  $A^1$ ,  $A^2$ ,  $A^3$ ,  $A^4$  и/или  $A^5$  в данном кольце, соответственно, представляет собой N.

Соединения формулы Z, предложенные в данном документе, представляют собой лиганды NLRX1.

Примеры соединений по данному изобретению показаны на фиг. 1A-1T.

В данном изобретении также предложены способы лечения состояния у животного соединением, как описано в данном документе. Указанные способы включают введение животному эффективного количества указанного соединения. Указанное состояние может быть выбрано из группы, включающей воспалительное желудочно-кишечное заболевание. В некоторых вариантах реализации изобретения указанное состояние включает воспалительное заболевание кишечника. В некоторых вариантах реализации изобретения указанное воспалительное заболевание кишечника включает язвенный колит. В некоторых вариантах воспалительное заболевание кишечника включает болезнь Крона. В некоторых вариантах реализации изобретения указанное состояние включает колоректальный рак.

Объекты и преимущества данного изобретения станут более понятными из следующего подробного описания предпочтительного варианта реализации данного изобретения, приведенного вместе с прилагаемыми графическими материалами.

### Краткое описание графических материалов

На фиг. 1A-1T показаны примеры соединений по данному изобретению: NX-5 (фиг. 1A), NX-8 (фиг. 1B), NX-9 (фиг. 1C), NX-10 (фиг. 1D), NX-13 (фиг. 1E); NX-35 (фиг. 1F); NX-37 (фиг. 1G); NX-38 (фиг. 1H); NX-41 (фиг. 1I); NX-43 (фиг. 1J); NX-44 (фиг. 1K); NX-45 (фиг. 1L); NX-46 (фиг. 1M); NX-48 (фиг. 1N); NX-49 (фиг. 1O); NX-50 (фиг. 1P); NX-53 (фиг. 1Q); NX-54 (фиг. 1R); NX-55 (фиг. 1S); и NX-56 (фиг. 1T).

На фиг. 2A-2E показано расчетное предсказание связывания выбранных соединений с NLRX1 в ккал/моль.

На фиг. 3 показана экспериментальная оценка связывания с NLRX1 выбранных соединений с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Представленные результаты представляют собой константы диссоциации в стационарном состоянии ( $K_D$ ), рассчитанные аппроксимированием к модели связывания 1:1 в микромолярном масштабе.

На фиг. 4A и 4B показана иммунологическая оценка активности NX-13 в CD4<sup>+</sup> спленоцитах. Процентное содержание IFN $\gamma$ <sup>+</sup> (фиг. 4A) и TNF $\alpha$ <sup>+</sup> (фиг. 4B) в CD4<sup>+</sup> T-клетках измеряли с помощью проточной цитометрии после обработки клеток *in vitro* NX-13 при концентрациях 0,1, 1 и 10 мкмоль/л. Статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) отмечена звездочками.

На фиг. 5A-5D показана иммунологическая оценка активности NX-45 и NX-50 в CD4<sup>+</sup> спленоцитах. Процентное содержание IFN $\gamma$ <sup>+</sup> (фиг. 5A и 5C) и TNF $\alpha$ <sup>+</sup> (фиг. 5B и 5D) в CD4<sup>+</sup> T-клетках измеряли с помощью проточной цитометрии после обработки клеток *in vitro* NX-45 (фиг. 5A и 5B) или NX-50 (фиг. 5C и 5D) при концентрациях 10, 50 и 100 нмоль/л (NX-45) или 0,1, 1 и 10 мкмоль/л (NX-50). Статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) отмечена звездочками.

На фиг. 6A-6J показана иммунологическая оценка активности NX-37, NX-43, NX-44 и NX-53, NX-54, NX-55 и NX-56 в CD4<sup>+</sup> спленоцитах. Процентное содержание IFN $\gamma$ <sup>+</sup> (фиг. 6A, 6C, 6E, 6G, 6H, 6I и 6J) и TNF $\alpha$ <sup>+</sup> (фиг. 6B, 6D и 6F) в CD4<sup>+</sup> T-клетках измеряли с помощью проточной цитометрии после обработки клеток *in vitro* NX-37 (фиг. 6A и 6B), NX-43 (фиг. 6C и 6D), NX-44 (фиг. 6E и 6F), NX-53 (фиг. 6G), NX-54 (фиг. 6H), NX-55 (фиг. 6I) или NX-56 (фиг. 6J) при концентрациях 0,1, 1 и 10 мкмоль/л. Статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) отмечена звездочками.

На фиг. 7A-7C показано подтверждение эффективности *in vivo* NX-13 на модели колита DSS. Показатели активности заболевания через 7 дней после заражения DSS (фиг. 7A) и измерения с помощью проточной цитометрии популяций нейтрофилов (фиг. 7B) и Th1 (фиг. 7C) в собственной пластинке слизистой оболочки толстой кишки на 7-й день у мышей, получавших носитель или NX-13 ежедневно через желудочный зонд. Статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) отмечена звездочками.

На фиг. 8A-8D показана экспрессия гена толстой кишки после обработки NX-13. Измерение Ifng (фиг. 8A), IL10 (фиг. 8B), Tnf (фиг. 8C) и IL17 (фиг. 8D) с помощью количественной ПЦР в реальном времени на РНК всей толстой кишки мышей, зараженных DSS в течение 7 дней и обработанных носителем или NX-13 ежедневно через желудочный зонд. Данные нормализовали по бета-актину. Статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) отмечена звездочками.

На фиг. 9 показано подтверждение эффективности *in vivo* NX-13 на модели колита MDR1a<sup>-/-</sup>. Оценка активности заболевания еженедельно в течение шестинедельного периода лечения, в течение которого мышей MDR1a<sup>-/-</sup> лечили носителем или NX-13 ежедневно через желудочный зонд. Статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) отмечена звездочками.

На фиг. 10A и 10B показаны репрезентативные микрофотографии окрашенных H&E срезов толстой кишки мышей MDR1a<sup>-/-</sup> после шести недель лечения носителем (фиг. 10A) или NX-13 (фиг. 10B).

На фиг. 11А-11С показана проточная цитометрия собственной пластинки толстой кишки мышей MDR1a-/- после шести недель лечения носителем или NX-13 для обнаружения популяций клеток Th1 (фиг. 11А), нейтрофилов (фиг. 11В) и Treg (фиг. 11С). Статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) отмечена звездочками.

На фиг. 12А и 12В показано трансляционное подтверждение эффективности NX-13 *ex vivo* в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) пациентов с язвенным колитом. Обнаружение проточной цитометрией клеток TNF $\alpha$ + (фиг. 12А) и IFN $\gamma$ + (фиг. 12В) после обработки *ex vivo* 1, 10, 50 и 100 нМ NX-13, представленное в виде процентного содержания клеток CD45+. Статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) отмечена звездочками.

На фиг. 13А-13Д показано трансляционное подтверждение эффективности NX-13 *ex vivo* в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) пациентов с болезнью Крона. Обнаружение проточной цитометрией клеток TNF $\alpha$ + (фиг. 13А), ИЛ4+ (фиг. 13В), ИЛ10+ (фиг. 13С) и IFN $\gamma$ + (фиг. 13Д) после обработки *ex vivo* 1, 10, 50 и 100 нМ NX-13, представленное в виде процентного содержания клеток CD45+. Статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) отмечена звездочками.

На фиг. 14А и 14В показана эффективность NX-43 в модели солидной опухоли СТ26 с инъекцией. Размер опухоли по диаметру (фиг. 14А) и массе (фиг. 14В) после обработки NX-43 (40 мг/кг) через 9 дней после инъекции клеток СТ26. Статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) отмечена звездочками.

На фиг. 15А и 15В показана эффективность NX-43 в модели колоректального рака APC<sup>min/+</sup>. Количество полипов толстой кишки (фиг. 15А) и масса толстой кишки (фиг. 15В) после четырех недель лечения NX-43 (40 мг/кг, перорально). Статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) отмечена звездочками.

### Подробное описание сущности изобретения

Общие определения.

Если не указано иное, в данной заявке используются следующие определения.

Дисперсионный анализ (ANOVA): арифметический процесс для разделения общей вариации в наборах данных на определенные компоненты на основе источников вариации. Его использовали для определения статистической значимости численных различий между группами лечения.

Конъюгированный диен: молекула, содержащая две двойные связи, разделенные простой связью.

Энантиомер: оптический изомер; химическая классификация молекул, основанная на их способности вращать плоскость поляризации по часовой стрелке (+) или против часовой стрелки (-).

По существу чистый: имеющий степень чистоты по меньшей мере 90% по массе, предпочтительно по меньшей мере 95% по массе, например по меньшей мере 98, 99 или около 100% по массе.

ВЗК: воспалительное заболевание кишечника (ВЗК) включает хроническое воспаление всего или части пищеварительного тракта. ВЗК, в первую очередь, включает язвенный колит и болезнь Крона. И то, и другое, как правило, сопровождается сильной диареей, болью, усталостью и потерей веса. ВЗК может быть изнурительным и иногда приводит к опасным для жизни осложнениям.

Язвенный колит (ЯК): ЯК представляет собой ВЗК, вызывающее длительное воспаление и болячки (язвы) во внутренней выстилке толстой кишки и прямой кишки.

Болезнь Крона: болезнь Крона представляет собой ВЗК, вызывающее воспаление слизистой оболочки пищеварительного тракта. При болезни Крона воспаление часто распространяется глубоко в пораженные ткани. Воспаление может поражать разные участки пищеварительного тракта - толстый кишечник, тонкий кишечник или и то, и другое.

ИЛ-10: интерлейкин-10 (ИЛ-10), также известный как фактор ингибирования синтеза цитокинов человека (CSIF), представляет собой противовоспалительный цитокин. У человека ИЛ-10 кодируется геном IL10.

FOXP3: FOXP3 (белок РЗ семейства Forkhead), также известный как скурфин, представляет собой белок, участвующий в ответах иммунной системы. Член семейства белков FOX, FOXP3, по-видимому, действует как главный регулятор (фактор транскрипции) в развитии и функционировании регуляторных Т клеток.

TNF-альфа: фактор некроза опухоли (ФНО, кахексин или кахектин, ранее известный как фактор некроза опухоли альфа или TNF $\alpha$ ) представляет собой цитокин, участвующий в системном воспалении, и является членом группы цитокинов, которые стимулируют реакцию острой фазы.

МСП1: хемоаттрактантный белок-1 моноцитов. Более старый термин для СС-цитокина, который имеет решающее значение в развитии атеросклеротических поражений, обнаруженных в эндотелиальных клетках, макрофагах и в клетках гладкой мускулатуры сосудов пациентов, подвергающихся процедурам шунтирования коронарной артерии. В настоящее время официально предпочтительным термином является хемокиновый (мотив С-С) лиганд 2.

Интерферон гамма: интерферон гамма представляет собой провоспалительный димеризованный растворимый цитокин, который является единственным членом класса интерферонов II типа.

Инфильтрация лейкоцитов: инфильтрация лейкоцитов относится к процессу перемещения или инфильтрации лейкоцитов в поврежденную ткань для начала процесса восстановления.

Химические определения.

Термин "алкил" сам по себе или как часть другого заместителя означает, если не указано иное, полностью насыщенный, с прямой цепью, с разветвленной цепью или циклический углеводородный радикал или их комбинацию, и может включать в себя ди- и поливалентные радикалы, с указанным числом атомов углерода (например,  $C_1$ - $C_{10}$  означает от одного до десяти атомов углерода, включительно). Примеры алкильных групп включают, без ограничения, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил, циклогексил, (циклогексил)этил, циклопропилметил, и их гомологи и изомеры, например н-пентил, н-гексил, н-гептил, н-октил и т.п. Термин "алкил", если не указано иное, включает циклоалкилы.

Термин "алкенил" обозначает алкильную группу, как определено выше, за исключением того, что она содержит одну или большее количество двойных связей. Примеры алкенильных групп включают в себя винил, 2-пропенил, кротил, 2-изопентенил, 2-(бутадиенил), 2,4-пентадиенил, 3-(1,4-пентадиенил) и т.д., а также высшие гомологи и изомеры.

Термин "алкинил" обозначает алкильную или алкенильную группу, как определено выше, за исключением того, что она содержит одну или большее количество тройных связей. Примеры алкинильных групп включают в себя этинил, 1-й 3-пропинил, 3-бутинил и т.п., включая в себя высшие гомологи и изомеры.

Термины "алкилен", "алкенилен" и "алкинилен" отдельно или как часть другой группы обозначают двухвалентный радикал, полученный из алкильной, алкенильной или алкинильной группы соответственно, как проиллюстрировано в качестве примера  $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ .

Как правило, алкильные, алкенильные, алкинильные, алкиленильные, алкениленильные и алкиниленильные группы будут иметь от 1 до 24 атомов углерода. Данные группы с 10 или меньшим числом атомов углерода являются предпочтительными в данном изобретении. Термин "низший" при применении к любой из данных групп, как в "низшем алкиле" или "низшем алкилене", обозначает группу с 10 или меньшим количеством атомов углерода. Примеры алкильных, алкенильных, алкинильных, алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп включают  $C_1$ - $C_{10}$ ,  $C_1$ - $C_8$  или  $C_1$ - $C_6$  алкильные, алкенильные, алкинильные, алкиленовые, алкениленовые или алкиниленовые группы.

Термин "ацил" означает радикал общей формулы  $-C(O)R$ , где R представляет собой алкильную группу.

Термин "алкокси" означает алкильную группу, связанную одинарной связью с кислородом:  $-O-R$ , где R представляет собой алкильную группу. Примеры включают метокси, этокси и т.п.

Термин "арил" используется в данном документе для обозначения ароматической группы, которая может представлять собой одно ароматическое кольцо или множество ароматических колец, которые конденсированы вместе, ковалентно связаны или связаны с общей группой, такой как диазо, метиленовый или этиленовый фрагмент. Общей связующей группой также может быть карбонил, как в бензофеноне. Ароматическое кольцо(а) может включать в себя, например, фенил, нафтил, бифенил, дифенилметил и бензофенон, среди прочих. Термин "арил" охватывает "замещенный арил". Для фенильных групп арильное кольцо может быть моно-, ди-, три-, тетра- или пентазамещенным. Кольца большего размера могут быть незамещенными или содержать один или большее количество заместителей.

Термин "арилалкил" используется в данном документе для обозначения группы, содержащей арильную и алкильную группу.

Термин "карбоксиалкил" используется в данном документе для обозначения группы, содержащей алкильную и карбоксильную группу (например,  $-C(O)O(C_1-C_6)$ алкил).

Термин "галоген" или "гало" используется в данном документе для обозначения атомов фтора, брома, хлора и йода.

Термин "гетеро", добавленный к названию любого фрагмента, описанного в данном документе, относится к группе, в которой неуглеродный атом заменяет атом углерода в указанном фрагменте. Любой фрагмент, описанный в данном документе, может быть представлен в гетеро форме. Примеры гетероатомов включают, среди прочего, азот, кислород, серу, фосфор, хлор, бром и йод.

Термин "гидрокси" используется в данном документе для обозначения группы  $-OH$ .

Термин "амино" используется для обозначения  $NRR'$ , где R и R' независимо представляют собой H, алкил, алкенил, алкинил, арил или их замещенные аналоги. "Амино" охватывает "алкиламино" и "диалкиламино", обозначающее вторичные и третичные амины. Каждая алкильная группа диалкиламино может быть выбрана независимо. Аминогруппы, где R и R' представляют собой H, называются "незамещенными аминогруппами". Аминогруппы, где R и R' представляют собой фрагмент, отличный от H, называются "замещенными аминогруппами".

Термин "ациламино" используется в данном документе для описания группы  $RC(O)NR'$ , где R представляет собой ацильную группу, а R' независимо представляет собой H, алкил, алкенил, алкинил, арил или их замещенные аналоги.

"Замещенный" относится к химической группе, как описано в данном документе, которая дополнительно содержит один или более заместителей, таких как низший алкил, арил, ацил, галоген (например, алкилгалоген, такой как  $CF_3$ ), гидрокси, амино, алкокси, алкиламино, ациламино, тиоамидо, ацилокси,

арилокси, арилоксиалкил, меркапто, тиа, аза, оксо, как насыщенные, так и ненасыщенные циклические углеводороды, гетероциклы и т.п. Данные группы могут быть присоединены к любому атому углерода или заместителю алкильных, алкенильных, алкинильных, алкиленильных, алкениленильных, алкиниленильных или других фрагментов, описанных в данном документе.

Для кислотных фрагментов, таких как карбоновые кислоты, название самой кислоты явно охватывает кислоту, ее сопряженное основание, а также их соли и сложные эфиры.

Для основных фрагментов, таких как аминогруппы, название самого основания явно охватывает основание, его сопряженную кислоту, а также их соли и кватернизованные версии.

Структуры, представленные без указанной стереохимии, включают все их стереоизомеры в любом соотношении (т.е. энантиомеры и диастериомеры, их рацемические смеси или любую смесь при любом энантиомерном/диастериомерном избытке).

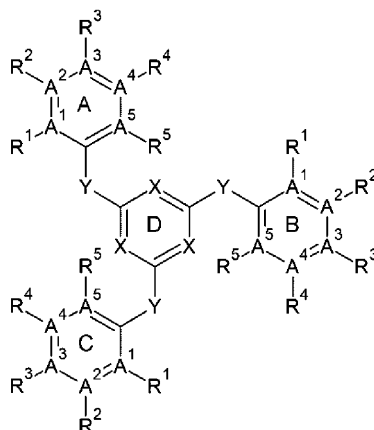
"Соль" представляет собой любую соль присоединения кислоты или основания. Соли, приведенные в данном документе, предпочтительно представляют собой фармацевтически приемлемые соли. "Фармацевтически приемлемая соль" представляет собой любую соль присоединения кислоты или основания, противоионы которой нетоксичны для пациента (включая ветеринарного пациента) в фармацевтических дозах указанных солей, так что благоприятные фармакологические эффекты, присущие свободному основанию или свободной кислоте, не сводятся к нулю побочными эффектами, приписываемыми противоионам. Огромное количество фармацевтически приемлемых солей хорошо известно в данной области техники. Для основных активных ингредиентов все соли присоединения кислоты пригодны в качестве источников формы свободного основания, даже если конкретная соль сама по себе желательна только в качестве промежуточного продукта, как, например, когда указанная соль образуется только для целей очистки или идентификации, или когда ее используют в качестве промежуточного продукта при получении фармацевтически приемлемой соли с помощью методик ионного обмена. Фармацевтически приемлемые соли включают, без ограничения, соли, полученные из минеральных кислот и органических кислот, включающие гидрогалогениды, например, гидрохлориды и гидробромиды, сульфаты, фосфаты, нитраты, сульфаматы, ацетаты, цитраты, лактаты, тартраты, малонаты, оксалаты, салицилаты, пропионаты, сукцинаты, фумараты, малеаты, метилен бис-*b*-гидроксинафтоаты, гентизаты, изетионаты, ди-*p*-толуилтартраты, метансульфонаты, этансульфонаты, бензолсульфонаты, *p*-толуолсульфонаты, циклогексилсульфаматы, хинаты и т.п. Соли присоединения оснований включают соли, полученные из оснований щелочных или щелочноземельных металлов или обычных органических оснований, таких как триэтиламин, пиридин, пиперидин, морфолин, *N*-метилморфолин и т.п. Термины "фармацевтически приемлемый" и "фармацевтически пригодный" используются в данном документе взаимозаменяемо.

Любая ссылка на "соединение" в данном документе или на структуру соединения, определенную в данном документе, охватывает как солевые, так и несолевые формы, если явно не указано иное.

Соединения.

Соединения по данному изобретению включают соединения формулы Z, имеющие кольцо A, кольцо B, кольцо C и кольцо D, или их фармацевтически приемлемые соли, где

Z представляет собой



X в каждом случае представляет собой CH;

Y в каждом случае независимо выбран из группы, включающей NR<sup>6</sup>, O, S, CH<sub>2</sub> и C=O, при условии, что Y между кольцом D и кольцом A представляет собой O;

A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, A<sup>4</sup> и A<sup>5</sup> в каждом случае независимо выбраны из группы, включающей N и C, при условии, что каждый из A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup> и A<sup>4</sup> в кольце A представляет собой C и A<sup>5</sup> в кольце A представляет собой N;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>6</sup>, когда они присутствуют, в каждом случае независимо выбраны из группы, включающей водород, гидрокси, amino и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, при условии, что любой из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> и/или R<sup>5</sup> в данном кольце отсутствует, когда A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, A<sup>4</sup> и/или A<sup>5</sup> в данном кольце, соответственно, представляет собой N.

В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере один из  $R^1$  и  $R^4$  в кольце А выбран из группы, состоящей из гидроксид, амино и  $C_1-C_6$  алкила.

В некоторых вариантах реализации изобретения  $R^4$  в кольце А выбран из группы, состоящей из гидроксид, амино и  $C_1-C_6$  алкила.

В некоторых вариантах реализации изобретения  $R^4$  в кольце А представляет собой  $C_1-C_6$  алкил.

В некоторых вариантах реализации изобретения  $R^1$ ,  $R^2$  и  $R^3$  в кольце А представляет собой водород.

В некоторых вариантах реализации изобретения

каждый Y представляет собой O;

$A^1$ ,  $A^2$ ,  $A^3$  и  $A^4$  в кольце В представляют собой C; и

$A^5$  в кольце В представляет собой N.

В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере один из  $R^1$  и  $R^4$  в кольце А и по меньшей мере один из  $R^1$  и  $R^4$  в кольце В выбран из группы, состоящей из гидроксид, амино и  $C_1-C_6$  алкила.

В некоторых вариантах реализации изобретения  $R^4$  в каждом кольце А и в кольце В выбран из группы, состоящей из гидроксид, амино и  $C_1-C_6$  алкила.

В некоторых вариантах реализации изобретения  $R^4$  в кольце А и  $R^4$  в кольце В все независимо представляют собой  $C_1-C_6$  алкил.

В некоторых вариантах реализации изобретения  $R^1$ ,  $R^2$  и  $R^3$  в каждом кольце А и в кольце В представляют собой водород.

В некоторых вариантах реализации изобретения

каждый Y представляет собой O;

каждый  $A^1$ , каждый  $A^2$ , каждый  $A^3$  и каждый  $A^4$  представляет собой C; и

каждый  $A^5$  представляет собой N.

В некоторых вариантах реализации изобретения каждый  $R^4$  выбран из группы, состоящей из гидроксид, амино и  $C_1-C_6$  алкила.

В некоторых вариантах реализации изобретения каждый  $R^4$  независимо представляет собой  $C_1-C_6$  алкил.

В некоторых вариантах реализации изобретения каждый  $R^1$ ,  $R^2$  и  $R^3$  представляет собой водород.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение является симметричным.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение является асимметричным.

В некоторых вариантах реализации изобретения

каждый  $R^1$ , если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода и  $C_1-C_6$  алкила;

каждый  $R^2$ , если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода и  $C_1-C_6$  алкила;

каждый  $R^3$ , если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода, гидроксид и амино;

каждый  $R^4$ , если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода, гидроксид,  $C_1-C_6$  алкила; и

каждый  $R^5$ , если он присутствует, представляет собой водород.

В некоторых вариантах реализации изобретения

каждый  $R^1$ , если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода и  $C_1-C_6$  алкила;

$R^2$  на каждом кольце А и кольце В, если он присутствует, представляет собой водород;

$R^2$  в кольце С, если он присутствует, выбран из группы, состоящей из водорода и  $C_1-C_6$  алкила;

$R^3$  на каждом кольце А и кольце В, если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода, гидроксид и амино;

$R^3$  на кольце С, если он присутствует, выбран из группы, состоящей из водорода и аминогруппы;

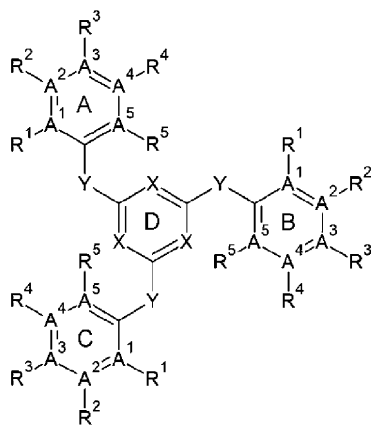
$R^4$  в каждом кольце А и кольце В, если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода и  $C_1-C_6$  алкила;

$R^4$  в кольце С, если присутствует, выбран из группы, состоящей из водорода, гидроксид и  $C_1-C_6$  алкила; и

$R^5$  на кольце С, если он присутствует, представляет собой водород.



В другом варианте реализации изобретения относится к соединению формулы Z, имеющее кольцо А, кольцо В, кольцо С и кольцо D, или его фармацевтически приемлемой соли, где Z представляет собой



X в каждом случае представляет собой CH;

Y в каждом случае представляет собой O;

A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup> и A<sup>4</sup> в каждом случае независимо выбраны из группы, состоящей из N и C, при условии, что по меньшей мере один из A<sup>1</sup> и A<sup>3</sup> на кольце А представляет собой C, а A<sup>2</sup> на кольце А представляет собой C;

A<sup>5</sup> в каждом случае представляет собой N;

R<sup>5</sup> в каждом случае отсутствует;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup>, когда они присутствуют, в каждом случае независимо выбраны из группы, включающей водород, гидроксигруппу, галоген, аминогруппу и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, при условии, что любой из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и/или R<sup>4</sup> в данном кольце отсутствует, когда A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup> и/или A<sup>4</sup> в данном кольце, соответственно, представляет собой N.

В некоторых вариантах реализации изобретения

каждый R<sup>1</sup>, если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила;

каждый R<sup>2</sup>, если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила;

каждый R<sup>3</sup>, если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода, гидроксигруппы и аминогруппы; и

каждый R<sup>4</sup>, если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода, гидроксигруппы, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила.

В некоторых вариантах реализации изобретения

каждый R<sup>1</sup>, если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила;

R<sup>2</sup> на каждом кольце А и кольце В, если он присутствует, представляет собой водород;

R<sup>2</sup> в кольце С, если он присутствует, выбран из группы, состоящей из водорода и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила;

R<sup>3</sup> на каждом кольце А и кольце В, если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода, гидроксигруппы и аминогруппы;

R<sup>3</sup> на кольце С, если он присутствует, выбран из группы, состоящей из водорода и аминогруппы;

R<sup>4</sup> в каждом кольце А и кольце В, если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила; и

R<sup>4</sup> в кольце С, если он присутствует, выбран из группы, состоящей из водорода, гидроксигруппы и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила.

В другом варианте реализации изобретения относится к способу лечения состояния у животного, включающему введение эффективного количества соединения по изобретению животному, где состояние представляет собой воспалительное желудочно-кишечное заболевание или злокачественное новообразование.

В некоторых вариантах реализации изобретения состояние представляет собой воспалительное желудочно-кишечное заболевание.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанное состояние представляет собой воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта и представляет собой воспалительное заболевание кишечника.

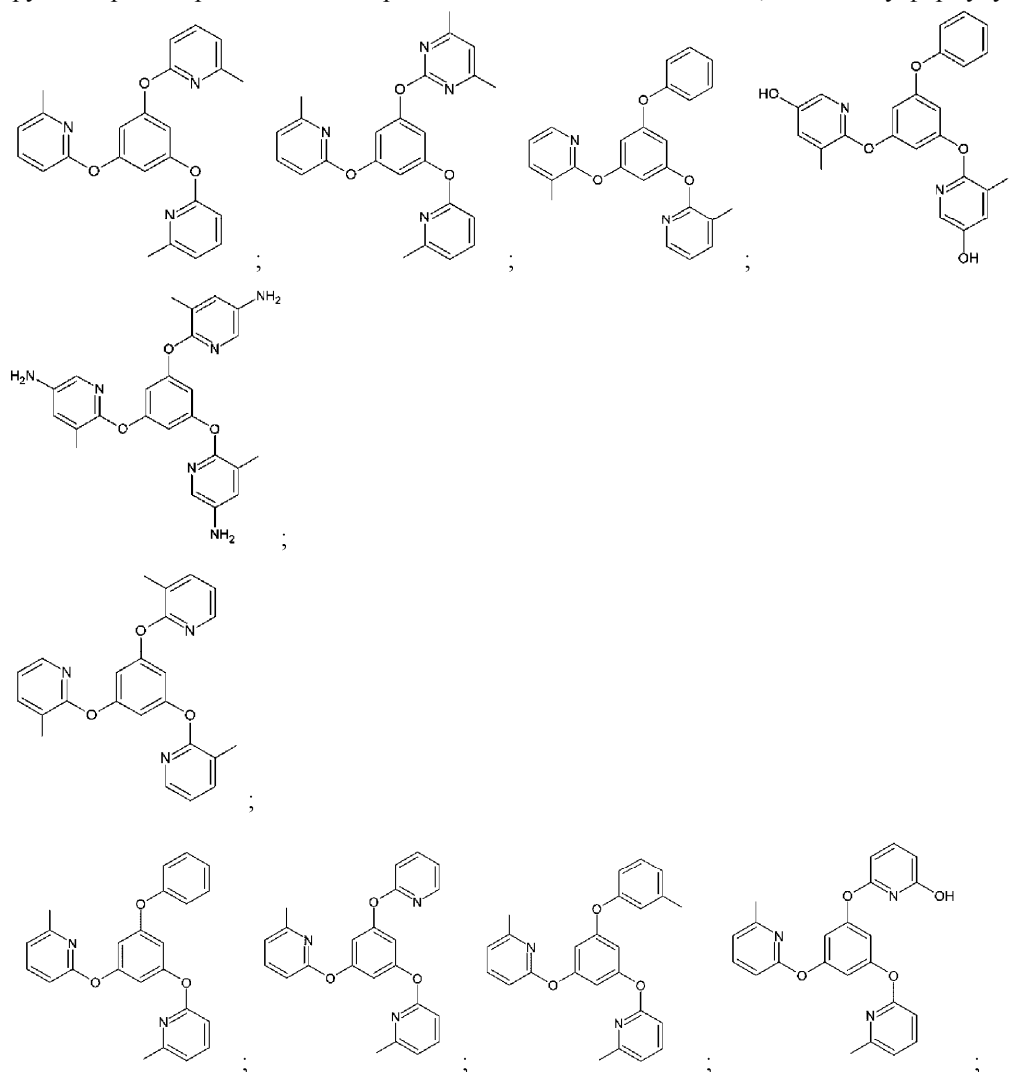
В некоторых вариантах реализации изобретения указанное воспалительное заболевание кишечника представляет собой язвенный колит.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанное воспалительное заболевание кишечника

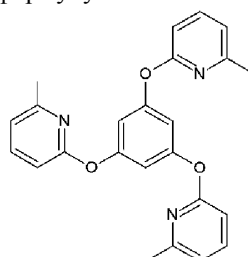
представляет собой болезнь Крона.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанное состояние представляет собой злокачественное новообразование, где указанное злокачественное новообразование представляет собой колоректальный рак.

В другом варианте реализации изобретения относится к соединению, имеющему формулу

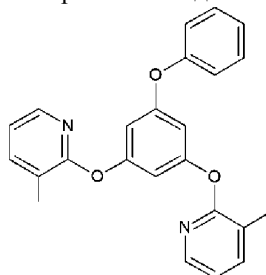


или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленного. В некоторых вариантах реализации изобретения соединение имеет формулу



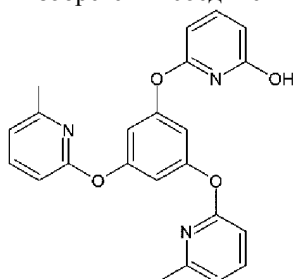
или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение имеет формулу



или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение имеет формулу

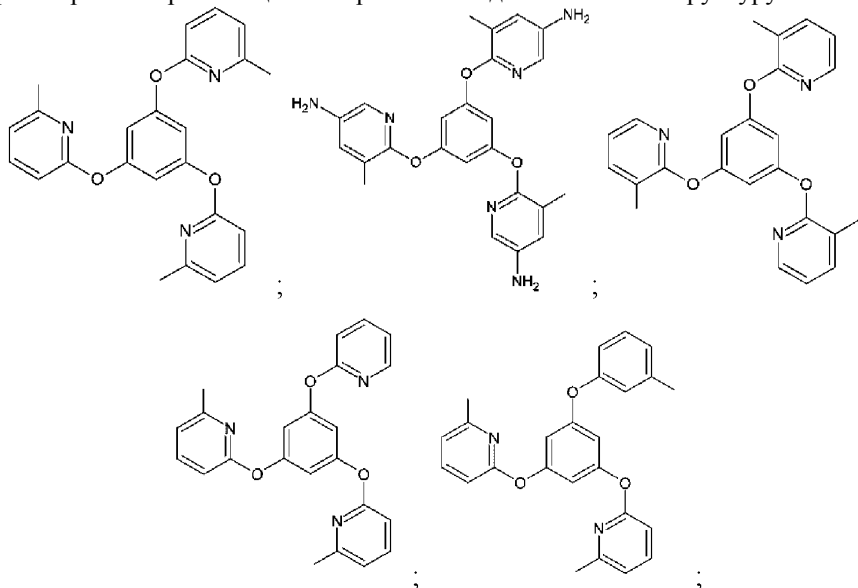


или его фармацевтически приемлемая соль.

В другом варианте реализации изобретения относится к способу лечения состояния у животного, включающий введение эффективного количества соединения по изобретению данному животному, где указанное состояние представляет собой воспалительное желудочно-кишечное заболевание или злокачественное новообразование.

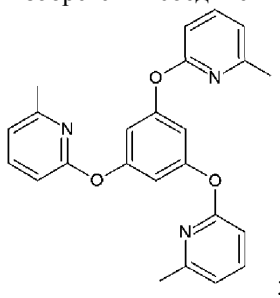
В некоторых вариантах реализации изобретения состояние представляет собой воспалительное желудочно-кишечное заболевание.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение имеет структуру



или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленного.

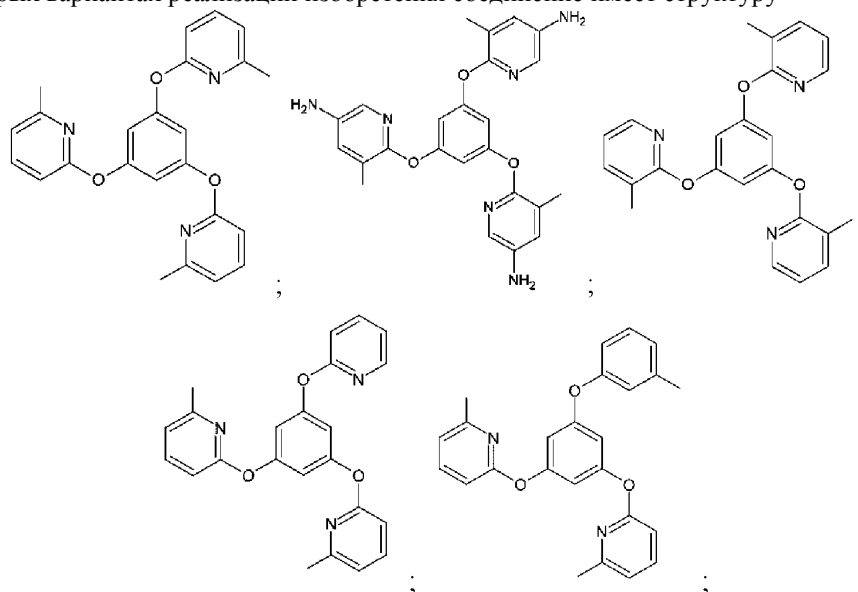
В некоторых вариантах реализации изобретения соединение имеет структуру



или его фармацевтически приемлемая соль.

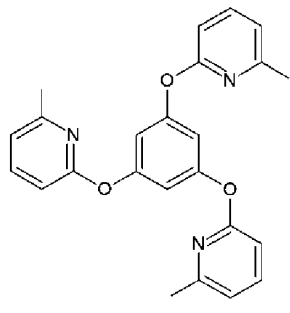
В некоторых вариантах реализации изобретения указанное состояние представляет собой воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта и представляет собой воспалительное заболевание кишечника.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение имеет структуру



или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленного.

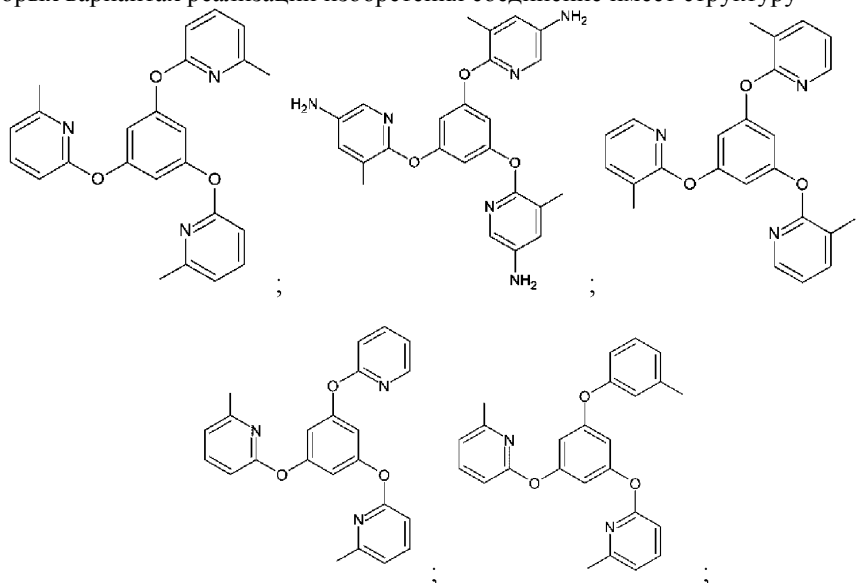
В некоторых вариантах реализации изобретения соединение имеет структуру



или его фармацевтически приемлемая соль.

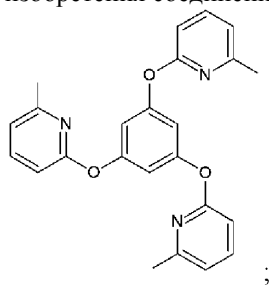
В некоторых вариантах реализации изобретения указанное воспалительное заболевание кишечника представляет собой язвенный колит.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение имеет структуру



или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленного.

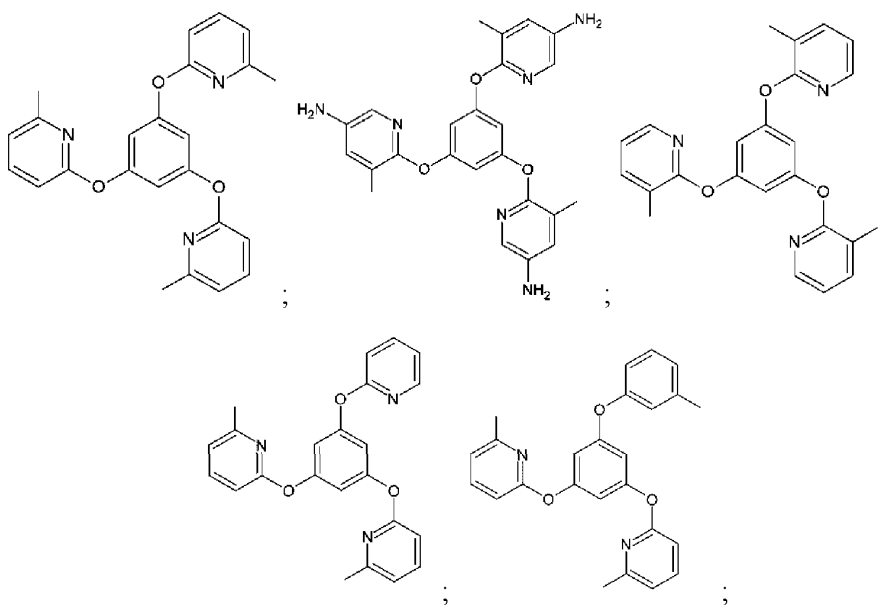
В некоторых вариантах реализации изобретения соединение имеет структуру



или его фармацевтически приемлемая соль.

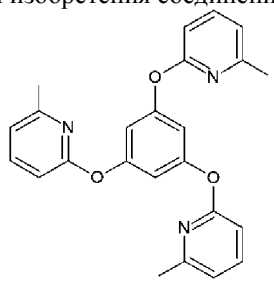
В некоторых вариантах реализации изобретения указанное воспалительное заболевание кишечника представляет собой болезнь Крона.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение имеет структуру



или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленного.

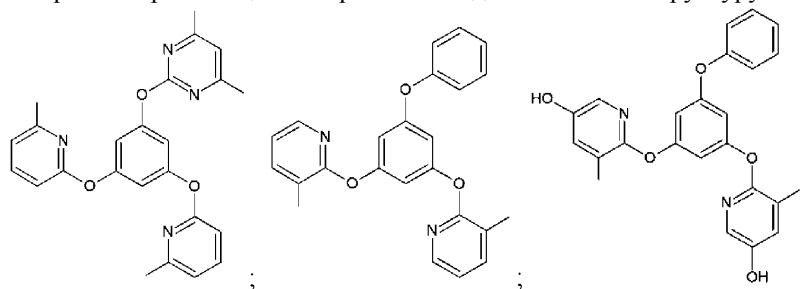
В некоторых вариантах реализации изобретения соединение имеет структуру

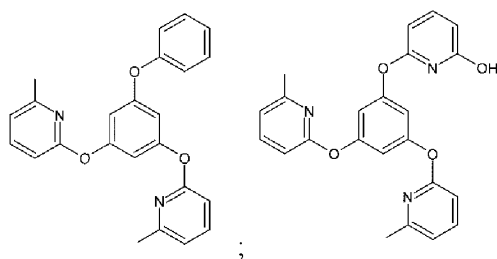


или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах реализации изобретения состояние представляет собой злокачественное новообразование.

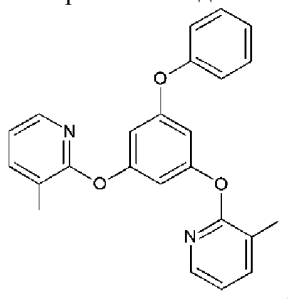
В некоторых вариантах реализации изобретения соединение имеет структуру





или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленного.

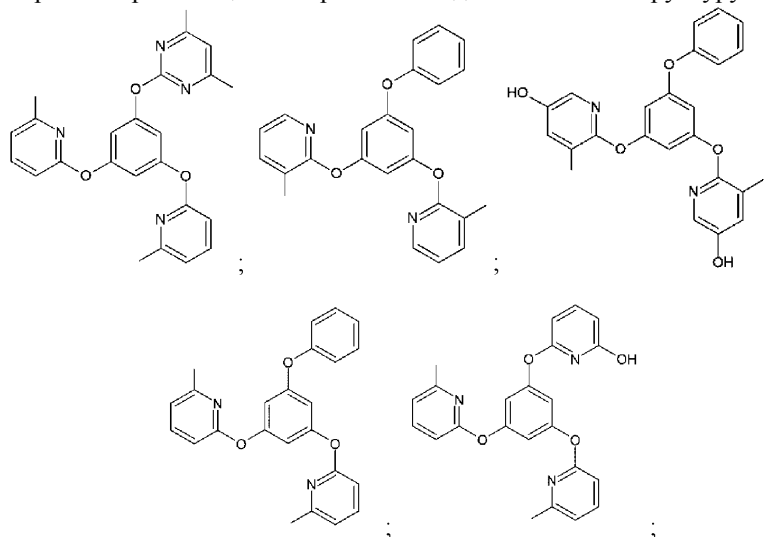
В некоторых вариантах реализации изобретения соединение имеет структуру



или его фармацевтически приемлемая соль.

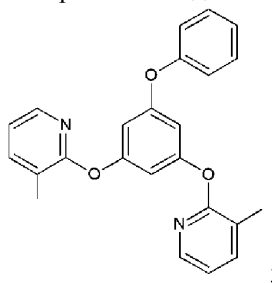
В некоторых вариантах реализации изобретения указанное состояние представляет собой злокачественное новообразование, и где указанное злокачественное новообразование представляет собой колоректальный рак.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение имеет структуру



или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленного.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение имеет структуру



или его фармацевтически приемлемая соль.

Любой вариант реализации соединений, описанных в данном документе, может быть объединен с любым другим вариантом реализации соединений, описанных в данном документе, если указанная комбинация явно не противоречит.

Введение.

В ходе способов данного изобретения, терапевтически эффективное количество соединений по данному изобретению может быть введено животному, включающему млекопитающих и людей, различ-

ными путями. Хотя в предпочтительном варианте реализации соединения по данному изобретению вводят перорально или парентерально, также предусмотрены и другие формы введения, такие как посредством медицинских соединений или аэрозолей.

Для перорального введения эффективное количество соединений может быть введено, например, в твердом, полутвердом, жидком или газообразном состоянии. Конкретные примеры включают в себя агенты в виде таблетки, капсулы, порошка, гранулы, раствора, суспензии, сиропа и эликсира. Однако соединения не ограничиваются этими формами.

Для приготовления соединений согласно данному изобретению в виде таблеток, капсул, порошков, гранул, растворов или суспензий, соединения предпочтительно смешивают с связующим, разрыхляющим агентом и/или смазывающим агентом. Если необходимо, полученная композиция может быть смешана с разбавителем, буфером, инфильтрующим агентом, консервантом и/или ароматизатором, используя известные способы. Примеры связующего вещества включают в себя кристаллическую целлюлозу, производные целлюлозы, кукурузный крахмал, циклодекстрины и желатин. Примеры разрыхляющего агента включают в себя кукурузный крахмал, картофельный крахмал и натрий карбоксиметилцеллюлозу. Примеры смазывающего агента включают в себя тальк и стеарат магния. Дополнительно также могут быть использованы добавки, которые используются традиционно, такие как лактоза и маннит.

Для парентерального введения, соединения по данному изобретению можно вводить ректально или путем инъекции. Для ректального введения может быть использован суппозиторий. Суппозиторий может быть приготовлен путем смешивания соединений согласно данному изобретению с фармацевтически подходящим наполнителем, который плавится при температуре тела, но остается твердым при комнатной температуре. Примеры включают в себя, но не ограничиваются лишь этими, масло какао, углеродный воск и полиэтиленгликоль. Полученная композиция может быть отлита в любую желаемую форму с использованием способов, известных в данной области техники.

Для введения путем инъекции, соединения согласно данному изобретению могут вводиться подкожно, внутривенно, внутримышечно или внутримышечно. Лекарственные препараты для такой инъекции могут быть приготовлены растворением, суспендированием или эмульгированием соединений согласно данному изобретению в водном или неводном растворителе, таком как растительное масло, глицерид синтетической смоляной кислоты, сложный эфир высшей жирной кислоты или пропиленгликоль, с помощью известного способа. При необходимости, также могут быть добавлены добавки, такие как солибилизующий агент, осморегулирующий агент, эмульгатор, стабилизатор или консервант, которые обычно используются. Хотя и не требуется, предпочтительно, чтобы композиция была стерильной или стерилизованной.

Для составления соединений по данному изобретению в виде суспензий, сиропов или эликсиров может быть использован фармацевтически приемлемый растворитель. В качестве неограничивающего примера, включена, помимо прочего, вода.

Соединения согласно данному изобретению также можно использовать вместе с дополнительным соединением, имеющим другую фармацевтически подходящую активность, для получения лекарственного средства. Лекарственное средство, либо содержащее соединение согласно данному изобретению в качестве отдельного соединения, либо в качестве части композиции, может быть использовано для лечения субъектов, нуждающихся в этом.

Соединения согласно данному изобретению также могут вводиться в форме аэрозоля или ингалянта, приготовленного путем загрузки соединений в форме жидкости или мелкого порошка, вместе с газообразным или жидким распыляющим агентом и, при необходимости, известным вспомогательным агентом, таким как газообразующий агент, в контейнер при обычном давлении, такой как аэрозольный баллончик или ингалятор. В качестве распыляющего агента может быть использован сжатый газ, например, дихлорфторметан, пропан или азот.

Соединения согласно изобретению могут вводиться животному, включая млекопитающих и людей, которые нуждаются в этом, в виде фармацевтической композиции, такой как таблетки, капсулы, растворы или эмульсии. Введение других форм соединений, описанных в данном изобретении, включающих, но не ограничиваясь ими, их сложные эфиры, их фармацевтически приемлемые соли, их метаболиты, их структурно родственные соединения, их аналоги и их комбинации, в виде одной дозы или в виде множества доз, также предусмотрено данным изобретением.

Соединения по данному изобретению можно также вводить животному, нуждающемуся в этом, в виде пищевой добавки, в виде либо питательной добавки, либо нутрицевтической добавки.

Термины "предупреждение", "лечение" или "облегчение" и подобные термины, используемые в данном документе, включают профилактику и полное или частичное лечение. Указанные термины могут также включать уменьшение симптомов, облегчение симптомов, уменьшение тяжести симптомов, уменьшение частоты возникновения заболевания или любое другое изменение состояния пациента, которое улучшает терапевтический результат.

Указанные соединения, описанные в данном изобретении, предпочтительно применяют и/или вводят в виде композиции. Подходящими композициями являются предпочтительно фармацевтическая композиция, пищевой продукт или пищевая добавка. Эти композиции обеспечивают удобную форму в

которой доставляются соединения. Композиции согласно данному изобретению могут содержать антиоксидант в количестве, эффективном для повышения стабильности соединений в отношении окисления или растворимости.

Количество соединения, которое вводят в способе согласно данному изобретению или которое предназначено для введения при использовании данного изобретения, представляет собой любое подходящее количество. Предпочтительно оно составляет от 1 нг/кг массы тела до 20 г/кг массы тела, более предпочтительно в диапазоне от 1 мкг/кг массы тела до 1 г/кг массы тела, например от 1 мг/кг массы тела до 100 мг/кг массы тела соединения в сутки. Пригодные композиции могут быть получены соответствующим образом. Специалисты в области дозирования биологически активных агентов смогут разработать конкретные схемы дозирования для различных субъектов на основе известных и хорошо понятных параметров.

Предпочтительная композиция по данному изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, например, в виде таблеток, пилюль, капсул, каплет, в виде множества частиц (включая гранулы, шарики, pellets и микроинкапсулированные частицы), порошков, эликсиров, сиропов, суспензий и растворов. Фармацевтические композиции, как правило, содержат фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. Фармацевтические композиции предпочтительно адаптированы к парентеральному или пероральному введению. Композиции для перорального введения могут быть в твердой или жидкой форме и могут принимать форму таблеток, порошков, суспензий и сиропов среди прочего. Не обязательно композиции содержат один или большее количество ароматизаторов и/или красителей. В целом терапевтические и пищевые композиции могут содержать любое вещество, которое не оказывает существенного влияния на действие соединений на субъекта.

Фармацевтически приемлемые носители, подходящие для использования в таких композициях, хорошо известны в области фармацевтики. Композиции согласно данному изобретению могут содержать 0,01-99% по массе соединений согласно данному изобретению. Композиции согласно данному изобретению обычно готовят в виде единицы формы дозирования. Предпочтительно доза единичной формы соединений, описанных в данном изобретении, составляет от 0,1 мг до 2000 мг, более предпочтительно от 50 до 1000 мг. Вспомогательные вещества, используемые при получении данных композиций, являются известными в данной области техники.

Дополнительные примеры форм продуктов для композиции представляют собой пищевые добавки, например, в виде мягкой гелеобразной или твердой капсулы, содержащей инкапсулирующий материал, выбранный из группы, состоящей из желатина, крахмала, модифицированного крахмала, производных крахмала, таких как глюкоза, сахароза, лактоза и фруктоза. Необязательно, инкапсулирующий материал может содержать сшивающие или полимеризующие агенты, стабилизаторы, антиоксиданты, светопоглощающие агенты для защиты светочувствительных наполнителей, консерванты и т.п. Предпочтительно доза единичной формы соединений, описанных в данном изобретении, составляет от 0,1 до 2000 мг, более предпочтительно от 50 до 1000 мг.

В целом термин "носитель" может быть использован во всей данной заявке для представления композиции, с которой описанные соединения могут быть смешаны, будучи ее фармацевтическим носителем, пищевым продуктом, пищевой добавкой или диетической добавкой. Материалы, описанные выше, могут считаться носителями для целей согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления согласно данному изобретению носитель практически не имеет биологической активности в отношении соединений согласно данному изобретению.

Доза. Способы согласно данному изобретению могут включать введение терапевтически эффективного количества соединения животному, нуждающемуся в этом. Эффективное количество соединения зависит от формы вводимого соединения, продолжительности введения, пути введения (например, перорального или парентерального), возраста животного и состояния животного, включая млекопитающих и людей.

Например, количество соединения, эффективное для лечения или предупреждения язвенного колита, болезни Крона, воспаления желудочно-кишечного тракта, инфекции *Clostridium difficile*, колоректального рака или любого другого состояния, описанного в данном документе у животного, может варьироваться от 1 нг/кг/сутки до 20 г/кг/сутки. Предпочтительное эффективное количество соединения составляет от 50 мкг/кг/сутки до 5 г/кг/сутки, более предпочтительная доза составляет от 1 до 100 мг/кг/сутки. Указанное эффективное количество соединения является наиболее эффективным при лечении или предупреждении воспалительного заболевания кишечника, в целом язвенного колита, болезни Крона, воспаления желудочно-кишечного тракта, инфекции *Clostridium difficile* или колоректального рака животного при введении животному в течение периодов от 1 до 1000 дней, предпочтительно периода от 7 до 300 дней и наиболее предпочтительно периода от 30 до 90 дней, при этом наиболее эффективным считается определение индукции положительных ответов. Эффективное количество соединения можно продолжать вводить после данных периодов для поддержания положительного ответа при хронических заболеваниях.

Количество соединения, наиболее эффективное для предотвращения чрезмерной активации иммунной системы, может составлять от 1 нг/кг/сутки до 20 г/кг/сутки, с предпочтительной дозой от 1 до 100 мг/кг/сутки.



Когда эффективное количество соединения по данному изобретению вводят в виде пищевой, терапевтической, медицинской или ветеринарной композиции, предпочтительная доза находится в диапазоне от около 0,01 до 2,0% мас./мас. еды или пищевого продукта.

В конкретных других вариантах реализации в данном изобретении предложено применение NLRX1-связывающих соединений, а также структурно родственных соединений, например соединения, выбранного из группы, состоящей из соединения, его сложных эфиров, его фармацевтически приемлемых солей, его метаболитов, его структурно родственных соединений, или их комбинаций, в лечении и профилактике ВЗК и воспаления желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

Кроме того, в целом данное изобретение относится к ингибированию или активации воспаления в ЖКТ, в котором соответствующие компоненты включают пищевод, желудок, тонкую кишку, слепую кишку, толстую кишку и прямую кишку. Эффект является результатом воздействия соединения на различные типы клеток в организме, которое вызывает биологический эффект. Указанные клетки могут включать клетки тканей ЖКТ, иммунные клетки (т.е. макрофаги, моноциты, лимфоциты) или эпителиальные клетки. В определенных вариантах реализации изобретения в данном изобретении предложено лечение субъектов соединением по данному изобретению, например, в виде диетической добавки, для уменьшения или предотвращения воспаления, связанного с воспалительным заболеванием кишечника, таким как либо болезнь Крона, либо язвенный колит. В данном изобретении также предложено введение соединений по данному изобретению в желудочно-кишечный тракт для подавления экспрессии молекул клеточной адгезии и хемоаттрактантов в кишечнике.

На практике способы согласно данному изобретению могут осуществляться путем введения соединений субъекту любым приемлемым путем введения, с использованием любой приемлемой формы, как описано выше, и позволяют организму субъекта транспортировать соединения в клетку-мишень посредством природных процессов. Как описано выше, указанное введение также можно осуществлять путем прямой инъекции в область (например, орган, ткань), содержащую клетку-мишень (т.е. клетку, подлежащую лечению).

Кроме того, введение может следовать любому количеству схем. Таким образом, оно может включать в себя однократную дозу, или введение дозы экспериментального соединения, или многократные дозы, или введение доз в течение периода времени. Следовательно, лечение может включать в себя повторение стадии введения один или большее количество раз, пока не будет достигнут желаемый результат. В некоторых вариантах осуществления лечение может продолжаться в течение продолжительных периодов времени, таких как недели, месяцы или годы. Режимы дозирования могут предпочтительно включать введение соединения от 6 раз в сутки до одного раза в неделю, более предпочтительно с режимом от трех раз в сутки до одного раза в сутки. Специалисты в данной области техники в полной мере способны легко разработать подходящие схемы введения доз для индивидов на основе известных в данной области техники параметров. Количества доз для соединений согласно данному изобретению могут быть использованы в способах таких вариантов осуществления данного изобретения. Для лечения ВЗК, воспаления ЖКТ или подавления экспрессии молекул клеточной адгезии в кишечнике предпочтительно введение указанных соединений в количествах от около 100 нг/сутки до 10 г/сутки.

Количество, подлежащее введению, будет изменяться в зависимости от субъекта, стадии заболевания или нарушения, возраста субъекта, общего состояния здоровья субъекта и других различных параметров, известных и обычно принимаемых во внимание специалистами в области медицины. Как правило, будет вводиться достаточное количество соединения для того, чтобы осуществить заметное изменение степени воспаления в ЖКТ, которое вместе с ВЗК часто связано с болью, которую испытывает индивид. У пациентов, которые в настоящее время не испытывают симптомов ВЗК, изменение, которое можно было бы найти, может включать параметры иммунных клеток, такие как уровни TNF $\alpha$  или С-реактивного белка в крови, процент регуляторных Т-клеток в крови или концентрацию кальпротектина в кале. В данном документе раскрыты подходящие количества, и дополнительные подходящие количества могут быть определены специалистами в данной области техники без чрезмерного или избыточного экспериментирования, на основании количеств, раскрытых в данном документе.

В одном аспекте в данном изобретении предложен способ лечения или предупреждения субъекта, страдающего от ВЗК, или других здоровых индивидов, возможно, с генетической предрасположенностью к болезни Крона или язвенному колиту, от развития ВЗК. Указанный способ может также включать лечение пациентов с рецидивирующей формой ВЗК. Согласно данному изобретению термин "субъект, страдающий от ВЗК" используется для обозначения субъекта (например, животного, человека), имеющего заболевание или нарушение, показывающее один или большее количество клинических признаков, типичных для ВЗК. В целом способ лечения или профилактики согласно этому аспекту данного изобретения включает в себя введение субъекту количества терапии соединением, которое эффективно для лечения или предотвращения родного или большего количества симптомов или клинических проявлений ВЗК, или для предотвращения развития такого симптома(ов) или проявления(ний).

Таким образом, в соответствии со способами по данному изобретению в данном изобретении могут быть предложены способы лечения ВЗК, воспаления, связанного с кишечной инфекцией, и воспаления, связанного с аутоиммунными заболеваниями. Способы лечения могут быть профилактическими спосо-

бами. В некоторых вариантах реализации изобретения указанный способ представляет собой способ лечения ВЗК, воспаления, связанного с кишечной инфекцией, и воспаления, связанного с аутоиммунными заболеваниями. В других вариантах осуществления изобретения, способ представляет собой способ профилактики ВЗК. В вариантах осуществления изобретения, способ представляет собой способ предотвращения перехода рецидивирующей формы ВЗК в активную. В еще других вариантах реализации изобретения указанный способ представляет собой способ улучшения состояния здоровья субъекта, страдающего от ВЗК, воспаления, связанного с кишечной инфекцией, и воспаления, связанного с аутоиммунными заболеваниями. Организмы, вызывающие инфекции желудочно-кишечного тракта, включают, но не ограничиваясь ими, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *pathogenic Vibrios*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica* и *Giardia lamblia*. Соответственно в некоторых вариантах осуществления изобретения, данное изобретение относится к способу защиты здоровья, органов и/или тканей субъекта, страдающего от ВЗК, воспаления, связанного с кишечной инфекцией, и воспаления, связанного с аутоиммунными заболеваниями, или с риском развития ВЗК, воспаления, связанного с кишечной инфекцией, и воспаления, связанного с аутоиммунными заболеваниями.

В одном варианте осуществления изобретения, способ лечения ВЗК включает в себя лечение ВЗК, не вызывающее заметных побочных эффектов, таких как значительное увеличение массы, системное подавление иммунитета, кушингоидная внешность, остеопения/остеопороз, или панкреатит, что является распространенным для доступных в настоящее время препаратов (т.е. кортикостероидов, ингибиторов фактора некроза опухоли альфа). Т.е. было обнаружено, что способ лечения согласно данному изобретению, который обеспечивает эффект лечения, по меньшей мере частично, путем воздействия на экспрессию и/или активацию NLRX1 в некоторых клетках, обеспечивает благоприятный эффект, не вызывая значительное увеличение массы, например, за счет удержания жидкости, у субъекта, подвергаемого лечению, по сравнению с другими аналогичными субъектами, не получающими лечение.

Как таковые, способы данного изобретения могут обеспечивать способы уменьшения воспаления. Способы могут уменьшать воспаление системно (т.е. по всему телу субъекта) или локально (например, в участке введения или в области воспалительных клеток, включающих в себя, но не ограниченных Т-лимфоцитами и макрофагами). При лечении или профилактике воспаления в соответствии со способами согласно данному изобретению одним из эффектов, который можно наблюдать, является уменьшение количества моноцитов или макрофагов и лимфоцитов, проникающих в кишечник. Другой может представлять собой увеличение популяций регуляторных иммунных клеток, таких как CD4+CD25+FoxP3+ регуляторные Т-лимфоциты, или увеличение регуляторных свойств лимфоцитов или макрофагов (например, увеличение ИЛ-10, или снижение TNF- $\alpha$  и ИЛ-6). Другое может представлять собой уменьшенное присутствие воспалительных генов и/или молекул адгезии. Таким образом, данные способы также могут рассматриваться как способы воздействия или изменения иммунного ответа субъекта, которому назначают терапию. Субъект может иметь воспалительное заболевание кишечника или другую патологию, при которой иммуномодуляция Т-лимфоцитов или отрицательная регуляция молекул клеточной адгезии является желаемым результатом.

В данном изобретении предложены способы лечения воспалительного, иммуноопосредованного или хронического заболевания желудочно-кишечного тракта с помощью соединений, описанных в данном документе. Неограничивающие примеры воспалительных, иммуноопосредованных или хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта включают, среди прочего, воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), эозинофильное заболевание желудочно-кишечного тракта, целиакию, некротический энтероколит, первичный склерозирующий холангит, хронический эрозивный гастрит, синдром раздраженного кишечника, амилоидоз тонкого кишечника, ишемический колит, лучевой колит, дивертикулит, лимфоцитарный колит и коллагенозный колит.

В данном изобретении предложены способы лечения системных иммуноопосредованных заболеваний с помощью соединений, описанных в данном документе. Неограничивающие примеры системных иммуноопосредованных заболеваний включают ревматоидный артрит, рассеянный склероз, системную красную волчанку, диабет 1 типа и псориаз.

Соединения, пригодные для уменьшения воспаления и эффекторных иммунных ответов, лечения воспалительных, иммуноопосредованных или хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта или лечения системных иммуноопосредованных заболеваний, включают агонисты NLRX1. Агонисты NLRX1 включают симметричные соединения формулы Z и их соли. Агонисты NLRX1 также включают асимметричные соединения формулы Z и их соли, где асимметрия является результатом одного и только одного из

(1) изменения C на N или N на C в одном или более составляющих (т.е. в одном или более из A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, A<sup>4</sup> или A<sup>5</sup>) в одном из кольца A, кольца B или кольца C по отношению к соответствующим составляющим (т.е. к одному или более из A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, A<sup>4</sup> или A<sup>5</sup> соответственно) в другом из кольца A, кольца B или кольца C; или

(2) замены определенного фрагмента на соседний гомолог в одном или более заместителей (т.е. в одном или более из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> или R<sup>5</sup>) в одном из кольца A, кольца B или кольца C по отношению к соответствующему заместителю (т.е. к одному или более из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> или R<sup>5</sup> соответственно) в другом

из кольца А, кольца В или кольца С.

Для целей в данном документе любой определенный фрагмент для  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  и/или  $R^5$ , включая водород, считается заместителем кольца, в котором он присутствует. Как используется в данном документе, термин "соседние гомологи" относится к двум фрагментам, которые отличаются только наличием или отсутствием одной метиленовой ( $-CH_2-$ ) группы. Таким образом, неограничивающие примеры соседних гомологов включают водород ( $-H$ ) и метил ( $-CH_3$ ); метил ( $-CH_3$ ) и этил ( $-CH_2CH_3$ );  $-OH$  и  $-CH_2OH$ ;  $-COOH$  и  $-COOCH_3$ ; и  $-COOCH_3$  и  $-CH_2COOCH_3$ . Чтобы быть точным, группы R, определенные как водород, и группы R, определенные как метил, рассматриваются в данном документе как соседние гомологи. Напротив, примеры фрагментов, которые не являются соседними гомологами, включают водород ( $-H$ ) и любой из этила ( $-CH_2CH_3$ ),  $-OH$ ,  $-CH_2OH$ ,  $-COOH$ ,  $-COOCH_3$ , и  $-CH_2COOCH_3$ ; метил ( $-CH_3$ ) и пропил ( $-CH_2CH_2CH_3$ ); и  $-COOH$  и  $-CH_2COOCH_3$ .

Указанные агонисты также пригодны для лечения желудочно-кишечных инфекций патогенных бактерий, например, с помощью агонистов, способствующих росту комменсальных штаммов бактерий и, таким образом, контролируя патогенные штаммы посредством конкурентного ингибирования.

Способы по данному изобретению могут обеспечивать способы увеличения воспаления. Указанные способы могут увеличивать воспаление системно (т.е. по всему телу субъекта) или локально (например, в участке введения или в области воспалительных клеток, включающих, но не ограничиваясь ими, Т-лимфоциты и макрофаги). При лечении или предупреждении воспаления в соответствии со способами по данному изобретению одним из эффектов, который можно наблюдать, представляет собой увеличение популяций иммунных клеток, таких как клетки  $CD4^+$  Tbet $^+$  Т-хелперы 1 или нейтрофилы, или увеличение продуцирования воспалительных цитокинов, таких как  $TNF-\alpha$  или  $IFN-\gamma$ . Таким образом, данные способы также могут рассматриваться как способы поддержания иммунного ответа субъекта, которому назначают терапию. Указанный субъект может страдать от инфекции или рака, при которых активация иммунной системы является благоприятной для лечения указанного заболевания.

В данном изобретении также предложены способы лечения инфекционного заболевания с помощью соединений, описанных в данном документе. Неограничивающие примеры таких инфекционных заболеваний включают в себя вирусные инфекции, бактериальные инфекции и грибковые инфекции.

Неограничивающие примеры вирусных инфекций включают инфекции, вызванные вирусами, такими как среди прочих вирусы семейства *adenoviridae*, такие как аденовирус; вирусы семейства *herpesviridae*, такие как простой герпес типа 1, простой герпес типа 2, вирус ветряной оспы, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус человека, вирус герпеса человека типа 8; вирусы семейства *papillomaviridae*, такие как вирус папилломы человека; вирусы семейства *polyomaviridae*, такие как вирус ВК и вирус JC; вирусы семейства *rosviridae*, такие как оспа; вирусы семейства *hepadnaviridae*, такие как вирус гепатита В; вирусы семейства *parvoviridae*, такие как бокавирус человека и парвовирус В19; вирусы семейства *astroviridae*, такие как астровирус человека; вирусы семейства *caliciviridae*, такие как вирус Норуолк; вирусы семейства *picornaviridae*, такие как вирус Коксаки, вирус гепатита А, полиовирус и риновирус; вирусы семейства *coronaviridae*, такие как вирус острого респираторного синдрома; вирусы семейства *flaviviridae*, такие как вирус гепатита С, вирус желтой лихорадки, вирус денге и вирус Западного Нила, вирусы семейства *togaviridae*, такие как вирус краснухи; вирусы семейства *hepeviridae*, такие как вирус гепатита Е; вирусы семейства *retroviridae*, такие как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ); вирусы семейства *orthomyxoviridae*, такие как вирус гриппа; вирусы семейства *arenaviridae*, такие как вирус Гуанарито, вирус Юнина, вирус Ласса, вирус Мачупо и вирус Сабиа; вирусы семейства *bunyaviridae*, такие как вирус конго-крымской геморрагической лихорадки; вирусы семейства *filoviridae*, такие как вирус Эбола и вирус Марбург; вирусы семейства *paramyxoviridae*, такие как вирус кори, вирус паротита, вирус парогриппа, респираторно-синцитиальный вирус, метапневмовирус человека, вирус Хендра и вирус Нипах; вирусы семейства *rhabdoviridae*, такие как вирус бешенства; неклассифицированные вирусы, такие как вирус гепатита D; и вирусы семейства *geoviridae*, такие как ротавирус, орбивирус, колтивирус и вирус Банна.

Неограничивающие примеры бактериальных инфекций включают в себя инфекции бактериями, описанными выше, в дополнение к *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila psittaci*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia rickettsii*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema pallidum*, *Tropheryma whippelii* и/или приводящим к болезни Уиппла, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, и другим видам из рода вышеуказанных организмов.

Неограничивающие примеры грибковых инфекций включают инфекцию грибами, такими как

грибки рода *Aspergillus*, такие как *Aspergillus fumigatus*, вызывающие аспергиллез; грибки рода *Blastomyces*, такие как *Blastomyces dermatitidis*, вызывающие бластомикоз; грибки рода *Candida*, такие как *Candida albicans*, вызывающие кандидоз; грибки рода *Coccidioides*, вызывающие кокцидиоидомикоз (лихорадка долины); грибки рода *Cryptococcus*, такие как *Cryptococcus neoformans* и *Cryptococcus gattii*, вызывающие криптококкоз; грибки-дерматофиты, вызывающие стригущий лишай; грибки, вызывающие грибковый кератит, такие как виды *Fusarium*, виды *Aspergillus* и виды *Candida*; грибки рода *Histoplasma*, такие как *Histoplasma capsulatum*, вызывающие гистоплазмоз; грибки порядка *Mucorales*, вызывающие мукормикоз; грибки рода *Saccharomyces*, такие как *Saccharomyces cerevisiae*; грибки рода *Pneumocystis*, такие как *Pneumocystis jirovecii*, вызывающие пневмоцистную пневмонию; и грибки рода *Sporothrix*, такие как *Sporothrix schenckii*, вызывающие споротрихоз.

В данном изобретении также предложены способы лечения злокачественных новообразований с помощью соединений, описанных в данном документе. Неограничивающие примеры рака включают колоректальный рак, рак горла, рак щитовидной железы, рак желудка, рак поджелудочной железы, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, острый миелоидный лейкоз, гепатоцеллюлярный рак, стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта, острый лимфобластный лейкоз, хронические миелопролиферативные нарушения, среди прочих.

Соединения, пригодные для усиления воспаления и эффекторных иммунных ответов или лечения инфекционного заболевания или злокачественного новообразования, включают антагонисты NLRX1. Антагонисты NLRX1 включают асимметричные соединения формулы Z, которые не подпадают под определение агонистов, приведенное выше. Примеры антагонистов NLRX1 включают асимметричные соединения формулы Z и их соли, где асимметрия является результатом

(1a) изменения C на N или N на C в одном или более составляющих (т.е. в одном или более из  $A^1$ ,  $A^2$ ,  $A^3$ ,  $A^4$  или  $A^5$ ) в одном из кольца A, кольца B или кольца C по отношению к соответствующим составляющим (т.е. к одному или более из  $A^1$ ,  $A^2$ ,  $A^3$ ,  $A^4$  или  $A^5$  соответственно) в другом из кольца A, кольца B или кольца C; и

(1b) замены определенного фрагмента на соседний гомолог в одном или более заместителей (т.е. в одном или более из  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  или  $R^5$ ) в одном из кольца A, кольца B или кольца C по отношению к соответствующему заместителю (т.е. к одному или более из  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  или  $R^5$  соответственно) в другом из кольца A, кольца B или кольца C; или

(2) замены определенного фрагмента на фрагмент, отличный от соседнего гомолога в одном или более заместителей (т.е. в одном или более из  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  или  $R^5$ ) в одном из кольца A, кольца B или кольца C по отношению к соответствующему заместителю (т.е. к одному или более из  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  или  $R^5$  соответственно) в другом из кольца A, кольца B или кольца C.

Принимая во внимание вышеуказанные способы, должно быть очевидно, что в данном изобретении предложено лечение с помощью NLRX1-связывающего соединения для применения в приведении в контакт с клетками, например, при лечении клеток субъекта. Вышеупомянутое обсуждение фокусируется на использовании соединений согласно данному изобретению в качестве части композиции для применения в том, что в целом можно считать фармацевтической или медицинской схемой лечения.

Соединения, описанные в данном изобретении для лечения ВЗК, воспаления ЖКТ и других описанных состояний, могут быть составлены в виде фармацевтической, пищевой композиции, функциональной пищевой композиции или диетической добавки.

В качестве лигандов NLRX1 соединения, описанные в данном документе, можно применять в качестве положительных контролей в анализах проверки связывания с NLRX1. Такие анализы включают анализы поверхностного плазмонного резонанса, как описано в примерах, или другие способы.

Элементы и стадии способа, описанного в данном документе, могут использоваться в любой комбинации, независимо от того, описаны они подробно или нет.

Все комбинации стадий способа, как используется в данном документе, могут быть выполнены в любом порядке, если не указано иное или явным образом противоположное не следует из контекста, в котором указана упоминаемая комбинация.

При использовании в данном документе, формы единственного числа включают в себя отсылки ко множественному числу, если в контексте явным образом не указывается иное.

Числовые диапазоны, как применяется в данном документе, предназначены для включения любого числа и подгруппы чисел, содержащихся в этом диапазоне, независимо от того явно они раскрыты или нет. Дополнительно эти числовые диапазоны следует рассматривать как обеспечивающие обоснование для пункта формулы, направленного на любое число или подгруппу чисел в этом диапазоне. Например, раскрытие от 1 до 10 следует рассматривать как обоснование для диапазона от 2 до 8, от 3 до 7, от 5 до 6, от 1 до 9, от 3,6 до 4,6, от 3,5 до 9,9 и т.д.

Все патенты, публикации патентов и рецензируемые публикации (т.е. "ссылки"), цитируемые в данном документе, явным образом включены посредством ссылки в том же объеме, как если бы каждая отдельная ссылка была конкретно и отдельно указана как включенная посредством ссылки. В случае противоречия между данным раскрытием и включенными ссылками данное раскрытие имеет преимущество.

Следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретной проиллюстрированной и

описанной конструкцией и расположением частей в ней, но охватывает такие ее модифицированные формы, находящиеся в пределах объема формулы изобретения.

### Примеры

Молекулярное моделирование.

Пример 1. Молекулярное моделирование лигандов NLRX1.

Используя ранее описанные лиганды NLRX1, включающие вирусную РНК и пищевые липиды (пунициновую кислоту и докозагексаеновую кислоту), мы определили наличие двух сайтов связывания с высоким потенциалом на белке NLRX1 [5]. Данные лиганды локировали к опубликованной структуре для С-конца NLRX1 (pdb: 3UN9) для установления важных связывающих остатков.

Способы.

Виртуальный Скрининг. Для получения дополнительной информации о предварительных каркасах, базы данных лигандов докировали к NLRX1 с помощью AutoDock Vina на каждом из двух сайтов с использованием кубоидной поисковой сетки размером (58×40×40 ангстрем) для обеспечения прогнозируемой аффинности связывания и конформаций лигандов. Аффинность связывания нормализовали на молекулярную массу лиганда. Для дальнейшего исследования позиции связывания отбирали лучшие лиганды.

Конструирование соединения. На основе идентифицированных остатков и предсказанных биохимических взаимодействий были сгенерированы структуры для лигандов NLRX1 с высокой аффинностью. Структуры генерировали и химически оптимизировали с помощью WebMo. Файлы структуры были созданы в формате.pdb и преобразованы в формат.pdbqt путем расчета зарядов методом Гастайгера. Структуры докировали с использованием AutoDock Vina для подтверждения аффинности связывания.

Анализ. Соединения предварительно ранжировали по наименьшей предсказанной аффинности связывания, нормированной к молекулярной массе, представляющей наиболее благоприятную позицию связывания за счет минимизации общей межмолекулярной энергии, полной внутренней энергии и свободной энергии кручения. Затем соединения были расставлены по приоритету на основе подходящего расстояния до критических связывающих остатков на NLRX1.

Результаты.

В результате виртуального скрининга и оптимизации новых химических соединений (NCE) было установлено, что соединения с вращательной симметрией 120° и подобные псевдосимметричные производные формулы Z, описанные в данном документе, обладают сильной аффинностью связывания с NLRX1. См фиг. 1A-1P. Данные NCE состояли из соединений с центральным бензольным или азабензольным кольцом, соединенным с тремя внешними кольцевыми структурами посредством одного линкерного атома. Аффинность связывания выбранных членов семейства представлена на фиг. 2A-2D. Прогнозируемая аффинность связывания в соответствующей конфигурации связывания с самой низкой энергией находилась в диапазоне от -8,9 до -11,7 ккал/моль. Для всех представленных соединений предсказанная аффинность связывания выше, чем у низкоаффинного лиганда NLRX1, пунициновой кислоты, которая имеет опубликованную аффинность связывания -6,2 ккал/моль. Было обнаружено, что соединение с высокой аффинностью связывания в данном классе NCE представляет собой 2,2'-(5-фенокси-1,3-фенилен)бис(окси)бис(3-метилпиридин), названный NX-43. Полностью симметричное соединение с высокой аффинностью связывания представляет собой 1,3,5-трис(6-метилпиридин-2-илокси)бензол, названный NX-13, при -10,6 ккал/моль. Замена кислородного линкера NX-13 метиленом (NX-38), карбониллом (NX-46) или серой (NX-48) несколько снижала прогнозируемое связывание, но связывание все еще превышало прогнозируемый порог лиганда. На основании результатов связывания и предсказанных физико-химических свойств из данного класса были выбраны соединения для синтеза и функционального тестирования.

Медицинская химия.

Пример 2. NX-13.

К раствору бензол-1,3,5-триола и 2-бром-6-метилпиридина в диметилформамиде добавляли карбонат калия и реакционную смесь облучали микроволновым излучением при 200 °C в течение 4 ч. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 1,3,5-трис(6-метилпиридин-2-илокси)бензола.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,767-7,728 (т, J=8,0 Гц, 3H), 7,042-7,024 (д, J=7,2 Гц, 3H), 6,849-6,829 (д, J=8,0 Гц, 3H), 6,667 (с, 3H), 2,352 (с, 9H).

Пример 3. NX-37.

Синтез 2-(3,5-бис(6-метилпиридин-2-илокси)фенокси)-4,6-диметилпиримидина (NX-37) представляет собой пятистадийный процесс, как подробно описано ниже.

К раствору 5-бромбензол-1,3-диола и 6-фтор-2-метилпиридина в диметилформамиде добавляли карбонат калия и реакционную смесь облучали микроволновым излучением при 200°C в течение 4 ч. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 6,6'-(5-бром-

1,3-фенилен)бис(окси)бис(2-метилпиридина).

К раствору 6,6'-(5-бром-1,3-фенилен)бис(окси)бис(2-метилпиридина) в этиленгликоле добавляли карбонат цезия и реакционную смесь нагревали при 120°C в течение 16 ч. Реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 2-(3,5-бис(6-метилпиридин-2-илокси)фенокси)этанола.

К раствору 2-(3,5-бис(6-метилпиридин-2-илокси)фенокси)этанола в диметилсульфоксиде добавляли гидроксид калия и нагревали при 100°C в течение 3 ч. Реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 3,5-бис(6-метилпиридин-2-илокси)фенола.

К 4,6-диметилпиримидин-2-олу при 0°C добавляли трихлорид фосфора и нагревали при 110°C в течение 16 ч. Растворитель упаривали из реакционной смеси. Реакционную смесь гасили ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 2-хлор-4,6-диметилпиримидина.

К раствору 3,5-бис(6-метилпиридин-2-илокси)фенола и 2-хлор-4,6-диметилпиримидина в диметилформамиде добавляли карбонат калия и реакционную смесь облучали микроволновым излучением при 200°C в течение 3 ч. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 2-(3,5-бис(6-метилпиридин-2-илокси)фенокси)-4,6-диметилпиримидина.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,56 (т, J=7,6 Гц, 2H), 6,89 (д, J=7,2 Гц, 2H), 6,83 (д, J=2,4 Гц, 2H), 6,78-6,77 (м, 2H), 6,72 (д, J=8,0 Гц, 2H), 2,46 (с, 6H), 2,40 (с, 6H).

Пример 4. NX-43.

Синтез 2,2'-(5-фенокси-1,3-фенилен)бис(окси)бис(3-метилпиридина) (NX-43) представляет собой двухстадийный процесс, как подробно описано ниже.

К раствору 5-бромбензол-1,3-диола и 2-фтор-3-метилпиридина в диметилформамиде добавляли карбонат калия. Реакционную смесь облучали микроволновым излучением при 200°C в течение 4 ч. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 2,2'-(5-бром-1,3-фенилен)бис(окси)бис(3-метилпиридина).

К раствору 2,2'-(5-бром-1,3-фенилен)бис(окси)бис(3-метилпиридина), фенола, каталитического количества иодида меди и диметилглицина в ДМФА добавляли карбонат цезия и реакционную смесь облучали микроволновым излучением при 150°C в течение 3 ч. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 2,2'-(5-фенокси-1,3-фенилен)бис(окси)бис(3-метилпиридина).

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,02 (д, J=3,6 Гц, 2H), 7,50 (д, J=7,2 Гц, 2H), 7,35-7,31 (м, 2H), 7,12-7,10 (м, 3H), 6,93-6,90 (м, 2H), 6,61-6,60 (м, 1H), 6,566-6,56 (т, J=2,4 Гц, 2H), 2,29 (с, 6H).

Пример 5. NX-44.

Синтез 6,6'-(5-фенокси-1,3-фенилен)бис(окси)бис(5-метил-3-пиридинола) (NX-44) представляет собой четырехстадийный процесс, как подробно описано ниже.

К раствору 5-бромбензол-1,3-диола и 2-фтор-3-метил-5-нитропиридина добавляли карбонат калия и перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 2,2'-(5-бром-1,3-фенилен)бис(окси)бис(3-метил-5-нитропиридина).

К раствору 2,2'-(5-бром-1,3-фенилен)бис(окси)бис(3-метил-5-нитропиридина), фенола, каталитического количества иодида меди и диметилглицина в ДМФА добавляли карбонат цезия и реакционную смесь облучали микроволновым излучением при 150°C в течение 3 ч. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 2,2'-(5-фенокси-1,3-фенилен)бис(окси)бис(3-метил-5-нитропиридина).

К перемешиваемому раствору 2,2'-(5-фенокси-1,3-фенилен)бис(окси)бис(3-метил-5-нитропиридина) в метаноле добавляли PtO<sub>2</sub>. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере водорода в течение 2 ч. Ход реакции контролировали с помощью ЖХ-МС. Реакционную смесь фильтровали через слой целита и упаривали фильтрат при пониженном давлении с получением 6,6'-(5-фенокси-1,3-фенилен)бис(окси)бис(5-метилпиридин-3-амина).

К перемешиваемому раствору 6,6'-(5-фенокси-1,3-фенилен)бис(окси)бис(5-метилпиридин-3-амина) в водном растворе серной кислоты при 80°C добавляли нитрит натрия в течение 1 ч. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 6,6'-(5-фенокси-1,3-фенилен)бис(окси)бис(5-метил-3-пиридинола).

Пример 6. NX-45.

Синтез 6,6',6''-(бензол-1,3,5-триилтрис(окси))трис(5-метилпиридин-3-амина) (NX-45) представляет

собой двухстадийный процесс, как подробно описано ниже.

К раствору бензол-1,3,5-триола и 2-фтор-3,6-диметил-5-нитропиридина в диметилформамиде добавляли карбонат калия и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 1,3,5-трис(3-метил-5-нитропиридин-2-илокси)бензола.

К перемешиваемому раствору 1,3,5-трис(3-метил-5-нитропиридин-2-илокси)бензола в метаноле добавляли  $PtO_2$ . Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере водорода в течение 2 ч. Ход реакции контролировали с помощью ЖХ-МС. Реакционную смесь фильтровали через слой целита и упаривали фильтрат при пониженном давлении с получением 6,6',6''-(бензол-1,3,5-триилтрис(окси))трис(5-метилпиридин-3-амин).

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $DMCO-d_6$ )  $\delta$  7,390 (д,  $J=2,4$  Гц, 3H), 6,91 (д,  $J=2,4$  Гц, 3H), 6,019 (с, 3H), 5,130 (уш с, 6H), 2,051 (с, 9H).

Пример 7. NX-50.

К перемешиваемому раствору бензол-1,3,5-триола в ДМСО порциями добавляли NaH в течение 2 ч. После этого по каплям добавляли 2-бром-3-метилпиридин и оставляли перемешиваться при 150°C в течение ночи. За ходом реакции следили. После конверсии исходного материала реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 1,3,5-трис(3-метилпиридин-2-илокси)бензола.

Пример 8. NX-53.

Синтез 2,2'-(5-фенокси-1,3-фенилен)бис(окси)бис(6-метилпиридина) (NX-53) представляет собой двухстадийный процесс, как подробно описано ниже.

К раствору 5-бромбензол-1,3-диола и 2-фтор-6-метилпиридина в диметилформамиде добавляли карбонат калия. Реакционную смесь облучали микроволновым излучением при 200°C в течение 4 ч. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 2,2'-(5-бром-1,3-фенилен)бис(окси)бис(6-метилпиридина).

К раствору 2,2'-(5-бром-1,3-фенилен)бис(окси)бис(6-метилпиридина), фенола, каталитического количества иодида меди и диметилглицина в ДМФА добавляли карбонат цезия и реакционную смесь облучали микроволновым излучением при 150°C в течение 3 ч. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 2,2'-(5-фенокси-1,3-фенилен)бис(окси)бис(6-метилпиридина).

Пример 9. NX-54.

Синтез 2,2'-(5-(пиридин-2-илокси)-1,3-фенилен)бис(окси)бис(6-метилпиридина) (NX-54) представляет собой четырехстадийный процесс, как подробно описано ниже.

К раствору 5-бромбензол-1,3-диола и 2-фтор-6-метилпиридина в диметилформамиде добавляли карбонат калия. Реакционную смесь облучали микроволновым излучением при 200°C в течение 4 ч. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 2,2'-(5-бром-1,3-фенилен)бис(окси)бис(6-метилпиридина).

К раствору 2,2'-(5-бром-1,3-фенилен)бис(окси)бис(6-метилпиридина) и этиленгликоля добавляли карбонат цезия и реакционную смесь облучали микроволновым излучением при 130°C в течение 6 ч. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 2,2'-(5-этанолокси-1,3-фенилен)бис(окси)бис(6-метилпиридина).

К раствору 2,2'-(5-этанолокси-1,3-фенилен)бис(окси)бис(6-метилпиридина) в диметилсульфоксиде добавляли гидроксид калия и реакционную смесь перемешивали при 120°C. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 2,2'-(1,3-фен-5-ол)бис(окси)бис(6-метилпиридина).

К раствору 2,2'-(1,3-фен-5-ол)бис(окси)бис(6-метилпиридина) и 6-хлорпиридина в диметилформамиде добавляли карбонат калия. Реакционную смесь облучали микроволновым излучением при 200°C в течение 4 ч. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 2,2'-(5-(пиридин-2-илокси)-1,3-фенилен)бис(окси)бис(6-метилпиридина).

Пример 10. NX-55.

Синтез 2,2'-(5-(6-метилфенокси)-1,3-фенилен)бис(окси)бис(6-метилпиридина) (NX-55) представляет собой двухстадийный процесс, как подробно описано ниже.

К раствору 5-бромбензол-1,3-диола и 2-фтор-6-метилпиридина в диметилформамиде добавляли карбонат калия. Реакционную смесь облучали микроволновым излучением при 200°C в течение 4 ч. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органиче-

ский слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 2,2'-(5-бром-1,3-фенилен)бис(окси)бис(6-метилпиридина).

К раствору 2,2'-(5-бром-1,3-фенилен)бис(окси)бис(6-метилпиридина), 6-метилфенола, каталитического количества иодида меди и диметилглицина в ДМФА добавляли карбонат цезия и реакционную смесь облучали микроволновым излучением при 150°C в течение 3 ч. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 2,2'-(5-(6-метилфенокси)-1,3-фенилен)бис(окси)бис(6-метилпиридина).

Пример 11. NX-56.

Синтез 2,2'-(5-(фен-6-ол)окси-1,3-фенилен)бис(окси)бис(6-метилпиридина) (NX-56) представляет собой четырехстадийный процесс, как подробно описано ниже.

К раствору 5-бромбензол-1,3-диола и 2-фтор-6-метилпиридина в диметилформамиде добавляли карбонат калия. Реакционную смесь облучали микроволновым излучением при 200°C в течение 4 ч. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 2,2'-(5-бром-1,3-фенилен)бис(окси)бис(6-метилпиридина).

К раствору 2,2'-(5-бром-1,3-фенилен)бис(окси)бис(6-метилпиридина) и этиленгликоля добавляли карбонат цезия и реакционную смесь облучали микроволновым излучением при 130°C в течение 6 ч. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 2,2'-(5-этанолокси-1,3-фенилен)бис(окси)бис(6-метилпиридина).

К раствору 2,2'-(5-этанолокси-1,3-фенилен)бис(окси)бис(6-метилпиридина) в диметилсульфоксиде добавляли гидроксид калия и реакционную смесь перемешивали при 120°C. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 2,2'-(1,3-фен-5-ол)бис(окси)бис(6-метилпиридина).

К раствору 2,2'-(1,3-фен-5-ол)бис(окси)бис(6-метилпиридина) и 6-хлорпиридин-2-ола в диметилформамиде добавляли карбонат калия. Реакционную смесь облучали микроволновым излучением при 200°C в течение 4 ч. Реакционную смесь разбавляли ледяной водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением 2,2'-(5-(фен-6-ол)окси-1,3-фенилен)бис(окси)бис(6-метилпиридина).

Связывание с рецептором.

Пример 12. Оценка связывания методом поверхностного плазмонного резонанса к NLRX1.

Введение.

Виртуальный скрининг и эксперименты *in silico* являются ценными средствами для выявления и определения приоритетов представляющих интерес каркасов при разработке новых низкомолекулярных лигандов для терапевтической мишени. Для подтверждения данных результатов существует множество методов *in vitro* для определения аффинности малой молекулы к интересующему белку. Одним из таких методов является поверхностный плазмонный резонанс, который представляет собой способность оценивать связывание в стационарном состоянии путем пропускания суспензии лиганда над иммобилизованным очищенным белком. Данный метод использовали для оценки предполагаемых лигандов NLRX1.

Способы.

Получение и очистка NLRX1. NLRX1 человека ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org); UniProtKB - Q86UT6 (NLRX1\_HUMAN)) клонировали в *E.coli*, амплифицировали и трансфицировали в *Pichia pastoris*. *P. pastoris* высевали в среду, селективную по аденину. Отбирали стабильные трансфицированные колонии и выращивали в питательной среде YPD при 30°C в течение 24 ч при встряхивании при 240 об/мин. Стартовую культуру использовали для инокуляции базовой среды (1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 1% сорбита, 2% азотного основания дрожжей), содержащей биотин и забуференной фосфатом калия. Инокулированную основную среду инкубировали при 30°C в течение 48 ч, 240 об/мин. Затем *P. pastoris* осаждали центрифугированием и ресуспендировали в среде для экспрессии (1% сорбита, 2% азотного основания дрожжей), содержащей биотин и забуференной фосфатом калия. Культуру индуцировали ежедневно для продуцирования белка путем добавления метанола и инкубировали при 28°C в течение 4 дней, 240 об/мин. После инкубирования клетки осаждали центрифугированием и лизировали ультразвуком. Рекомбинантный белок NLRX1 очищали с помощью быстрой жидкостной хроматографии белков (AktaPrime) с использованием аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом. Фракции белка элюировали в аликвоты по 1 мл и их оценивали на содержание NLRX1. Мутировавший белок NLRX1 генерировали с использованием аналогичных способов для нарушения связывания в пределах предсказанного сайта связывания путем изменения четырех остатков на аланин (D677A, F680A, F681A и E684A).

Поверхностный плазмонный резонанс. Для оценки связывания с белком NLRX1 использовали Biacore T200. В качестве белков для иммобилизации на сенсорном чипе CM5 использовали NLRX1-ДТ и NLRX1-Мутант. NLRX1-ДТ разводили в 10 мМ натрий-ацетатном буфере при pH 4,0 и иммобилизовали на проточной ячейке до уровня ~3700 ЕО с использованием стандартной химии сочетания с аминогруппами.



пой. NLRX1-Мутант разводили в 10 мМ натрий-ацетатном буфере при pH 4,0 и иммобилизовали на проточной ячейке до уровня ~3100 ЕО с использованием стандартной химии сочетания с аминогруппой. В качестве рабочего буфера иммобилизации использовали 20 мМ MOPS, 150 мМ NaCl, 5 мМ ацетат натрия, 1 мМ ЭДТА, 0,05% Tween-20 буфер с pH 8,0 (рабочий буфер). На основании значений иммобилизованного ответа были рассчитаны теоретические значения  $R_{\max}$ . Значения  $R_{\max}$  предполагают механизм взаимодействия 1:1. Кинетику в течение ночи проводили для всех анализов, связывающихся с иммобилизованными белками. Кинетические эксперименты проводили в присутствии рабочего буфера+1% ДМСО. Скорость потока всех растворов поддерживали на уровне 50 мкл/мин. Концентрации аналита составляли 0, 2,5, 5, 10, 20 и 40 мкМ.

#### Результаты.

Поверхностный плазмонный резонанс подтвердил предсказанное связывание NX-13, NX-37 и NX-43 с NLRX1 (фиг. 3). В частности, NX-13, NX-37 и NX-43 были идентифицированы как малые молекулы, которые связываются с NLRX1 с различной аффинностью и физико-химическими свойствами. Потеря связывания с мутированным белком NLRX1 (фиг. 3) подтвердила, что предсказанный сайт связывания является основным сайтом связывания данных лигандов. NX-13 связывается с белком NLRX1 с  $K_D$  30,2 мкМ (фиг. 3).

#### Экспериментальные исследования.

##### Пример 13. Иммунологический скрининг *in vitro*.

#### Введение.

Центральное место в патогенезе многих аутоиммунных заболеваний занимает дисфункция CD4+ Т-хелперных клеток [3]. Данные клетки важны для поддержания здоровья человека, усиления иммунных ответов и поддержания гомеостаза. Однако в случае аутоиммунного и воспалительного заболевания CD4+ Т-хелперные клетки могут стать сверхактивными, активироваться при отсутствии стимулов или неспособными разрешить воспаление. В данных сценариях терапевтические средства, которые могут уменьшить или предотвратить воспаление, являются ценными методами лечения заболевания. С этой целью мы подтвердили функциональный терапевтический потенциал противовоспалительных лигандов NLRX1 в данном типе клеток.

В отличие от аутоиммунных заболеваний, некоторые инфекционные заболевания и рак требуют усиления воспалительных ответов для эффективного контроля или устранения причины заболевания [30]. Следовательно, терапевтические агенты могут влиять на ответы в CD4+ Т-хелперных клетках, усиливая иммунные ответы и вызывая воспаление. В этих случаях увеличение количества эффекторных клеток, таких как Т-хелперы 1 и Т-хелперы 17, может принести пользу индивиду за счет увеличения продуцирования  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , ИЛ-17 и ИЛ-6. Как свидетельствуют опубликованные результаты NLRX1 на моделях рака [17, 18, 21], модуляция пути NLRX1 может генерировать данные ответы.

#### Способы.

Клеточная культура. У мышей C57BL/6 вырезали селезенки. Селезенки раздавливали между замороженными концами предметных стекол для микроскопа и фильтровали с получением суспензии клеток. Эритроциты лизировали гипотоническим лизисом. Оставшиеся клетки промывали и фильтровали. CD4+ Т-клетки обогащали в суспензии с использованием отрицательной селекции на основе магнитной сортировки. Клетки собирали и высевали на 96-луночные планшеты, покрытые анти-CD3, и культивировали в присутствии NX-13, NX-37, NX-43, NX-44 или NX-50 при 0, 0,1, 1 или 10 мкмоль/л; NX-53, NX-54, NX-55 или NX-56 при 0, 0,1 или 1 мкмоль/л; или NX-45 при 10, 50 или 100 нмоль/л в течение 48 ч. В течение последних 6 ч культивирования клетки стимулировали форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА) и иономицином.

Иммунологический анализ. Клетки собирали из 96-луночных планшетов и окрашивали коктейлем антител для иммунофенотипирования с помощью проточной цитометрии. Супернатант культур собирали и анализировали концентрацию цитокинов с помощью цитометрического анализа с гранулами. Данные были получены с помощью проточного цитометра BD FACS Celesta и проанализированы с использованием программного обеспечения FACS Diva.

#### Результаты.

NX-13 уменьшал долю  $IFN\gamma$ -продуцирующих и  $TNF\alpha$ -продуцирующих CD4+ Т-клеток в культуре клеток дикого типа (фиг. 4А и 4В). В отсутствие NLRX1 данные эффекты были утеряны (фиг. 4А и 4В).

NX-45 тестировали при 10, 50 и 100 нмоль/л *in vitro* (фиг. 5А и 5В). В CD4+ Т-клетках NX-45 снижает количество клеток  $TNF\alpha^+$  (фиг. 5В) и  $IFN\gamma^+$  (фиг. 5А). Значительное снижение количества клеток  $TNF\alpha^+$  происходит при концентрациях 10 нМ и выше, в то время как значительное снижение количества клеток  $IFN\gamma^+$  происходит при концентрациях 50 нМ и выше. NX-50 также уменьшал количество клеток  $IFN\gamma^+$  и  $TNF\alpha^+$ , хотя и в более высоких концентрациях (фиг. 5С и 5D). NX-55 обеспечивал лишь небольшое снижение количества клеток, продуцирующих  $IFN\gamma$  (фиг. 6I), а NX-54 давал минимальные эффекты при высоких концентрациях (фиг. 6H).

Из-за подавления воспалительных цитокинов данные результаты показывают, что NX-13, NX-45 и NX-50 являются активаторами NLRX1. Учитывая потерю активности в клетках с дефицитом NLRX1,

данное семейство молекул действует через путь NLRX1. В сочетании с результатами связывания *in silico* и *in vitro* действия по пути NLRX1 являются результатом прямого связывания с NLRX1.

NX-37, NX-43, NX-44, все являются эффективными в усилении воспалительных ответов с различными сигнатурами (фиг. 6A-6F). В обоих случаях NX-37 (фиг. 6A и 6B), NX-43 (фиг. 6C и 6D), NX-44 (фиг. 6E и 6F) увеличивали долю клеток, продуцирующих TNF $\alpha$  (фиг. 6B, 6D, 6F) и IFN $\gamma$  (фиг. 6A, 6C, 6E), по данным проточной цитометрии. NX-53 и NX-56 слабо увеличивали количество клеток, продуцирующих IFN $\gamma$  (фиг. 6G и 6J). Было обнаружено, что NX-43 оказывает больший эффект, чем NX-37, на клетки, продуцирующие TNF $\alpha$ , и клетки, продуцирующие IFN $\gamma$ , в то время как NX-37 проявляет дозозависимые эффекты в пределах испытанного диапазона. Ни одна из малых молекул не вызвала изменений в клетках, продуцирующих ИЛ-10.

На основании описанных результатов и опубликованных сведений о пути NLRX1, NX-37, NX-43 и NX-44 действуют как специфические ингибиторы NLRX1 посредством прямого связывания. Наблюдаемое усиление воспалительных ответов при лечении данными ингибиторами согласуется с наблюдением, что дефицит NLRX1 приводит к усилению воспаления.

Пример 14. Применение NX-13 в острой модели ВЗК.

Введение.

Воспалительное заболевание кишечника представляет собой многофакторное заболевание, при котором многие болезненные процессы инициируются действием или дисфункцией эпителиального барьера [31]. Известная и общепринятая модель заболевания на животных вызывается введением декстран-сульфата натрия (DSS) в питьевую воду мышей. Поступление DSS нарушает и разрушает эпителиальный барьер в дистальных отделах желудочно-кишечного тракта, особенно, в толстой кишке. Нарушение эпителиального барьера способствует проникновению микробиома в слизистую оболочку толстой кишки с последующим привлечением и активацией иммунных клеток. Данная модель позволяет оценить новые терапевтические средства в управляемой системе воспаления кишечника.

Ранее модель DSS использовали для определения того, что у мышей, дефицитных по NLRX1, тяжесть заболевания ухудшалась по сравнению с мышами дикого типа, которые экспрессируют NLRX1 [3, 4]. Кроме того, когда экспрессию NLRX1 у мышей дикого типа оценивали в течение всего периода времени DSS, NLRX1 подавлялся в периоды сильного воспаления, что свидетельствует о том, что фармакологическая активация молекулы может защищать от данной пониженной экспрессии и индуцировать полезные противовоспалительные действия.

Способы.

Модель ДСН. Мышам давали 8% (мас./об.) DSS в питьевой воде в течение семи дней, чтобы вызвать разрушение эпителиального слоя. В начале проекта мышам было 8 недель, и им начинали дозирование через 24 ч после того, как их помещали на 8% DSS. Мышей ежедневно взвешивали и оценивали на предмет симптомов заболевания (диарея, ректальное кровотечение, воспаление прямой кишки, общее поведение).

Введение лечения. NX-13 готовили в 0,5% растворе метилцеллюлозы (12-15 сП). Используемая дозировка составляла 20 мг/кг один раз в сутки. Мышей взвешивали еженедельно для обновления состава дозирования. Дозировку рассчитывали на основе средней массы тела для каждого пола. Пероральную дозу вводили через желудочный зонд в объеме 0,2 мл.

Проточная Цитометрия. Толстые кишки помещали в буфер RPMI/ФБС, содержащий коллагеназу (300 Ед/мл) и ДНКазу (50 Ед/мл) для расщепления. Ткани расщепляли в течение 60 мин при 37°C при перемешивании. Полученные клеточные суспензии фильтровали через сетчатые фильтры 100 мкм, центрифугировали (300 $\times$ g, 8 мин) и промывали свежим RPMI. После фильтрации полученных суспензий отдельных клеток, иммунные клетки очищали градиентом 40% перколлы, содержащего клетки, которым покрывали 70%-ный раствор перколлы. После центрифугирования интерфазу собирали и промывали для получения обогащенных фракций клеток собственной пластинки слизистой оболочки толстой кишки. Клетки метили смесью внеклеточных (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, NK1.1, CD25, F4/80, CD11b, Gr1, CX3CR1, CD64) и внутриклеточных (Tbet, ROR $\gamma$ T, FOXP3, ИФН $\gamma$ , ИЛ17, ИЛ10) антител с последующим окрашиванием живых клеток в 96-луночных планшетах. Данные были получены с использованием проточного цитометра FACS Celesta с программным обеспечением FACSDiva.

Экспрессия Генов. Общую РНК из толстой кишки и клеток получали с использованием мини-набора Qiagen RNeasy. кДНК получали с использованием набора для синтеза кДНК BioRad iScript. Стандартные кривые были получены путем серийного разбавления очищенного продукта из стандартной реакции ПЦР с ДНК-полимеразой Taq с последующей очисткой с использованием набора для очистки Qiagen MinElute PCR. Уровни экспрессии были получены используя количественную ПЦР в реальном времени с супермиксом SybrGreen на термоциклере BioRad CFX96 с последующей нормализацией относительно экспрессии  $\beta$ -актина.

Результаты.

Пероральное введение NX-13 снижает активность заболевания у мышей дикого типа, зараженных DSS. Активность заболевания в данной модели колита представляет собой суммарную оценку потери

веса, наличия и тяжести ректального кровотечения, консистенции кала, симптомов боли и общего поведения мыши. NX-13 снижал активность заболевания в течение всего заражения с максимальным наблюдаемым снижением на 50% на день 6 (фиг. 7A).

В рамках модели DSS заболевание инициируется в эпителии, но модулируется наличием и обилием иммунных клеток в собственной пластинке толстой кишки. Основными факторами воспаления и повреждения тканей в данной модели являются Т-хелперные клетки 1 и нейтрофилы. Пероральное лечение NX-13 значительно уменьшало количество Th1 и нейтрофильных клеток в собственной пластинке толстой кишки по данным измерения с помощью проточной цитометрии. На день 7 заражения DSS количество как нейтрофилов (фиг. 7B), так и клеток Th1 (фиг. 7C) уменьшилось более чем на 50%. Однако NX-13 не уменьшал количество FOXP3+ регуляторных CD4+ Т-клеток, которые являются первичным типом клеток толстой кишки, ответственным за гомеостаз тканей.

РНК выделяли из всей толстой кишки мышей, которым вводили носитель и NX-13, на 7 день после заражения DSS. Для измерения экспрессии генов воспалительных и противовоспалительных цитокинов использовали РНК (фиг. 8A-D). Обработка NX-13 снижала экспрессию Ifng (фиг. 8A), Tnfa (фиг. 8C) и IL17 (фиг. 8D) во всей толстой кишке, одновременно увеличивая экспрессию IL10 (фиг. 8B). Важно отметить, что IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  являются двумя основными факторами воспаления при ВЗК. Снижение уровня данных цитокинов в толстой кишке после перорального приема NX-13 является ключевым маркером эффективности.

Пример 15. Применение NX-13 в хронической модели ВЗК.

Введение.

Болезнь Крона и язвенный колит представляют собой хронические заболевания со спорадическими периодами нерешенных воспалительных обострений, приводящих к прогрессирующему повреждению слизистой оболочки кишечника [32, 33]. Потеря Mdr1a у мышей ухудшает способность эпителиальных клеток правильно обрабатывать и выводить продукты жизнедеятельности, что приводит к спонтанному колиту [34]. Колит у данных мышей является хроническим и проникает через слои кишечника. Таким образом, модель Mdr1a $^{-/-}$  является идеальной моделью для тестирования постоянного приема терапевтического средства для индукции и поддержания сниженной тяжести заболевания [35] из-за использования иммунокомпетентных животных, внутренней дисфункции механизмов эпителиальных клеток, выраженных воспалительных ответов и трансляционной значимости гена MDR1 как нового аллеля риска при ВЗК человека [36].

Способы.

Модель MDR1a $^{-/-}$ . У мышей с дефицитом MDR1a спонтанно развивается колит. Мыши MDR1a $^{-/-}$  начали получать лечение NX-13 (перорально, 20 мг/кг) в возрасте 4 недель и лечение продолжали до возраста 10 недель. Мышей взвешивали и оценивали еженедельно.

Введение лечения. NX-13 готовили в 0,5% растворе метилцеллюлозы (12-15 сП). Используемая дозировка составляла 20 мг/кг один раз в сутки. Мышей взвешивали еженедельно для обновления состава дозирования. Дозировку рассчитывали на основе средней массы тела для каждого пола. Пероральную дозу вводили через желудочный зонд в объеме 0,2 мл.

Проточная цитометрия. Толстые кишки помещали в буфер RPMI/ФБС, содержащий коллагеназу (300 Ед/мл) и ДНКазу (50 Ед/мл) для расщепления. Ткани расщепляли в течение 60 мин при 37°C при перемешивании. Полученные клеточные суспензии фильтровали через сетчатые фильтры 100 мкм, центрифугировали (300 $\times$ g, 8 мину) и промывали свежим RPMI. После фильтрации полученных суспензий отдельных клеток, иммунные клетки очищали градиентом 40% перколла, содержащего клетки, которым покрывали 70%-ный раствор перколла. После центрифугирования интерфазу собирали и промывали для получения обогащенных фракций клеток собственной пластинки слизистой оболочки толстой кишки. Клетки метили смесью внеклеточных (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, NK1.1, CD25, F4/80, CD11b, Gr1, CX3CR1, CD64) и внутриклеточных (Tbet, ROR $\gamma$ T, FOXP3, IFN $\gamma$ , IL17, IL10) антител с последующим окрашиванием живых клеток в 96-луночных планшетах. Данные были получены с использованием проточного цитометра FACS Celesta с программным обеспечением FACSDiva.

Гистопатология. Окрашенные ГЭ срезы толстой кишки готовили из частей толстых кишок, собранных в 10% забуференный формалин и помещенных в парафин. Препараты были изучены сертифицированным ветеринарным патологоанатомом с помощью микроскопа Olympus, и изображения были получены с помощью программного обеспечения Image-Pro. Образцы были оценены (0-4) на лейкоцитарную инфильтрацию, эпителиальную эрозию и утолщение слизистой оболочки.

Результаты

Пероральное введение NX-13 снижает активность заболевания у мышей Mdr1a $^{-/-}$ . Активность заболевания в данной модели колита представляет собой суммарную оценку потери веса, наличия и тяжести ректального кровотечения, консистенции кала, симптомов боли и общего поведения мыши. NX-13 снижал активность заболевания в течение всего заражения с максимальным наблюдаемым снижением на 70% на шестой неделе лечения (фиг. 9).

У мышей MDR1a $^{-/-}$  пероральный прием NX-13 значительно уменьшал патологию толстой кишки

(фиг. 10А и 10В). После шести недель лечения NX-13 защищал от развития агрегатов лейкоцитов и утолщения слизистой оболочки. Кроме того, NX-13 уменьшал общую инфильтрацию лейкоцитов и эрозию эпителия.

Пероральный NX-13 значительно изменяет долю иммунных клеток в собственной пластинке толстой кишки (фиг. 11А и 10В). В частности, NX-13 снижает долю Th1 (фиг. 11А) и нейтрофилов (фиг. 11В), двух основных подгрупп клеток, ответственных за воспаление в слизистой оболочке толстой кишки. Кроме того, количество макрофагов F4/80hi, а также Т-клеток, продуцирующих ИЛ-17 и IFN $\gamma$ , значительно снижалось при лечении NX-13. Доля регуляторных CD4+ Т-клеток (Treg) (фиг. 11С) также увеличивалась в толстой кишке. Эти данные показывают, что NX-13 способен восстанавливать баланс между воспалительными и противовоспалительными ответами в толстой кишке мышей с колитом.

Пример 16. Эффективность NX-13 в мононуклеарных клетках периферической крови человека.

Введение.

Люди, страдающие от болезни Крона и язвенного колита, имеют гиперактивные иммунные клетки с высокой распространенностью воспалительных субпопуляций локально в желудочно-кишечном тракте и системно в крови. Следовательно, мононуклеарные клетки, выделенные из периферической крови (МКПК) пациентов с ВЗК, часто демонстрируют многие из устойчивых воспалительных ответов, наблюдаемых в слизистой оболочке ЖКТ из-за окружающей среды, в которой они находятся, и генетических аномалий, присутствующих во всех клетках индивидуума. Трансляционное применение NX-13 тестировали на МКПК пациентов с язвенным колитом и болезнью Крона для определения противовоспалительного действия лечения NX-13 на клетки человека.

Способы.

Выделение МКПК. Образцы получали от доноров мужского и женского пола, которые клинически классифицировались как имеющие умеренное или тяжелое заболевание. Возраст и принимаемые лекарства не использовались в качестве критериев исключения. Цельную кровь собирали в гепаринизированные вакуумные пробирки. Цельную кровь разводили 1:3 по объему стерильным фосфатно-солевым буферным раствором. LeucoSep (Greiner) получали путем добавления среды для разделения лимфоцитов с последующим 15-секундным центрифугированием на максимальной скорости. Разбавленную цельную кровь добавляли в пробирки LeucoSep. После центрифугирования (2000 $\times$ g, 20 мин) МКПК собирали из интерфазы с помощью пипетки Пастера. Оставшиеся эритроциты лизировали гипотоническим лизисом и суспензию фильтровали через сетчатый фильтр 100 мкм для клеток. МКПК промывали и ресуспендировали в стерильной среде для культивирования клеток, RPMI, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, 2,5% раствора Нерес, 1% L-глутамин, 1% пенициллина/стрептомицина, 1% пирувата натрия и 1% незаменимых аминокислот (полная RPMI).

Клеточная культура. Клетки-мишени инкубировали в полной культуральной среде RPMI при 37 $^{\circ}$ C в течение 24 ч. Клетки инкубировали в присутствии NX-13 при концентрации от 1 до 100 нМ. Исходный раствор NX-13 готовили при 100 мМ в диметилсульфоксиде (ДМСО) и разбавляли до желаемой концентрации в культуральной среде. Концентрации ДМСО были отрегулированы так, чтобы являться одинаковыми для всех доз и обработок носителем. За 6 ч до анализа клетки стимулировали форбол 12-миристат-13-ацетатом (ФМА) и иономицином для стимулирования клеточной активации. Клетки анализировали на получение желаемых данных через 24 ч.

Проточная цитометрия. Перед сбором клетки инкубировали BD GolgiStop (2 мкл GolgiStop на 3 мл общей среды) для обеспечения внутриклеточного накопления цитокинов.

Клетки окрашивали на жизнеспособность на внеклеточные (CD45, CD3, CD4, CD8, CD11b) и внутриклеточные (FOXP3, ИЛ-10, ИЛ-4, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) белки последовательным способом. Данные были получены с помощью проточного цитометра BD FACS Celesta и проанализированы с использованием программного обеспечения FACS Diva. Нежизнеспособные и несинглетные клетки исключали из анализа. Данные представлены в виде процента CD45+ клеток или % жизнеспособных синглетов.

Результаты.

В образцах язвенного колита NX-13 снижал процент CD4+ Т-клеток, продуцирующих TNF $\alpha$  (фиг. 12А) и IFN $\gamma$  (фиг. 12В), при этом значительное снижение наблюдалось в обеих популяциях при концентрациях 10 нМ и выше. Хотя при 1 нМ значительного снижения TNF не наблюдали, тенденции к снижению соответствовали тем, которые наблюдали при более высоких концентрациях (фиг. 12А). Напротив, значительное снижение IFN $\gamma$  наблюдали даже при 1 нМ (фиг. 12В). Кроме того, NX-13 снижал количество TNF $\alpha$ , присутствующего в каждой клетке по данным измерения по средней интенсивности флуоресценции дозозависимым образом.

Подобно тестам ЯК, NX-13 сильно снижал количество CD4+ Т-клеток, продуцирующих TNF $\alpha$  и ИЛ-4, при концентрациях всего 10 нМ в МКПК от пациентов с болезнью Крона (фиг. 13А и 13В). Кроме того, обработка NX-13 увеличивала процент ИЛ10+ CD4+ Т-клеток при концентрациях 50 нМ и выше (фиг. 13С), что позволяет предположить, что NX-13 способен действовать прорегулирующим образом в дополнение к прямому противовоспалительному эффекту на эффекторные CD4+ Т-клетки. Дозозависимое снижение наблюдалось в клетках IFN $\gamma$ + при выше 50 нМ NX-13 (фиг. 13D).

Эти результаты показывают, что NX-13 представляет собой перспективную малую молекулу для активации NLRX1 в клетках человека и для ингибирования воспалительных реакций.

Пример 17. Эффективность NX-43 в мышинной модели аденокарциномы.

Введение.

Девяносто пять процентов случаев колоректального рака составляют аденокарциномы. Аденомы или полипы, если они не обнаружены при рутинной колоноскопии, могут распространяться в стенку кишечника из эпителия и в конечном итоге метастазировать после попадания в кровь или лимфу. Если не считать рака толстой кишки 1 стадии, который обычно можно лечить путем удаления полипа или пораженного участка, пятилетняя выживаемость мала и колеблется от 63-87% для рака 2 стадии до 11% для рака 4 стадии, согласно данным Американского Онкологического Общества. Были получены убедительные доказательства того, что для развития рака необходимы стимулирующие факторы, помимо генетической нестабильности, неограниченного распространения и устойчивости к апоптозу. Данные факторы, такие как местный ангиогенез, измененный метаболизм и уклонение от иммунного надзора, привели к появлению нового поколения противораковых препаратов, способных улучшать прогноз на промежуточных и поздних стадиях. Как иммунный регулятор, выполняющий важную функцию как в иммунных, так и в эпителиальных клетках кишечника, NLRX1 может служить мощной мишенью для лечения колоректального рака.

Способы.

Мышиная модель. Взрослым мышам BALB/c вводили подкожно  $5 \times 10^6$  клеток карциномы CT26 в задний пах. Мышам ежедневно вводили NX-43 в дозе 40 мг/кг через желудочный зонд, начиная с дня 9. Мышей взвешивали ежедневно, а диаметр опухоли измеряли каждые 3 дня вплоть до дня 21. Опухоли собирали при вскрытии. Использовали вторую мышиную модель. Мышам APC<sup>min/+</sup> вводили DSS с питьевой водой, начиная с возраста 5 недель. Мышам вводили DSS в общей сложности 5 дней до возврата к стандартной питьевой воде. После DSS мышам вводили NX-43 (40 мг/кг) через желудочный зонд в течение четырех недель. Через четыре недели толстую кишку вырезали и промывали. Подсчитывали количество полипов и определяли массы толстой кишки.

Экспрессия Генов. Общую РНК из опухолей и лимфатических узлов можно получать с использованием мини-набора Qiagen RNeasy. кДНК можно получать с использованием набора для синтеза кДНК BioRad iScript. Стандартные кривые могут быть получены путем серийного разбавления очищенного продукта из стандартной реакции ПЦР с ДНК-полимеразой Taq с последующей очисткой с использованием набора для очистки Qiagen MinElute PCR. Уровни экспрессии могут быть получены используя количественную ПЦР в реальном времени с супермиксом SybrGreen на термоциклере BioRad CFX96 с последующей нормализацией относительно экспрессии Р-актина, как описано ранее [12]. Экспрессию генов можно измерять для генов, маркирующих активацию иммунной системы, таких как воспалительные цитокины или поверхностные рецепторы, подавление иммунитета, таких как CTLA-4, PD-1 или ARG-1, а также рост опухоли и метастазирование.

Гистопатология. Окрашенные H&E срезы опухоли и лимфатического узла можно получить из ткани, помещенной в 10% забуференный формалин и залитой парафином. Препараты могут быть изучены сертифицированным ветеринарным патологоанатомом с помощью микроскопа Olympus, и изображения можно получать с помощью программного обеспечения Image-Pro. Образцы можно оценивать на предмет наличия лейкоцитов, инфильтрирующих в опухоль, участков некроза и доли пролиферирующих опухолевых клеток.

Проточная цитометрия. Опухоли и лимфатические узлы могут быть помещены в буфер RPMI/ФБС, содержащий коллагеназу (300 Ед/мл) и ДНКазу (50 Ед/мл) для расщепления. Ткани можно расщеплять в течение 60 мин при 37°C при перемешивании. Полученные клеточные суспензии можно фильтровать через сетчатые фильтры 100 мкм, центрифугировали (300×g, 8 мин) и промывали свежим RPMI. После фильтрации полученных суспензий отдельных клеток, иммунные клетки могут быть очищены градиентом 40% перколла, содержащего клетки, которым покрывали 70%-ный раствор перколла. После центрифугирования интерфазу можно собирать и промывать для получения обогащенных фракций иммунных клеток. Клетки можно метить смесью внеклеточных (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, NK1.1, CD25, F4/80, CD11b, Gr1, CX3CR1, CD64, CD40, CTLA4) и внутриклеточных (Tbet, RORγT, FOXP3, ИФНγ, ИЛ17, ИЛ10, гранзим В, iNOS) антител с последующим окрашиванием живых клеток в 96-луночных планшетах. Данные могут быть получены с использованием проточного цитометра FACS Celesta с программным обеспечением FACSDiva.

Результаты.

Модель солидной опухоли CT26 представляет собой высокоиммуногенную модель карциномы, что делает ее ценной моделью при оценке новых терапевтических средств. Ингибиторы NLRX1, такие как NX-43, уменьшают размер опухоли по сравнению с необработанными контролями (фиг. 14А и 14В). Примечательно, что уменьшение диаметра опухоли наблюдали менее чем через 10 дней после начала лечения NX-43. Между тем через 12 дней лечения общая масса опухоли уменьшилась более чем на 70%. В модели колоректального рака APC<sup>min/+</sup> (фиг. 15А и 15В) после воспалительного лечения NX-43 умень-

шало количество полипов толстой кишки и общую опухолевую нагрузку (о чем свидетельствует масса толстой кишки). Ожидается, что гистологически данные эффекты будут коррелировать с увеличением доли лейкоцитов, инфильтрирующих в опухоль. Ожидается, что экспрессия генов, активирующих иммунную систему, возрастет, в то время как супрессивные гены будут подавлены. С помощью проточной цитометрии ожидается уменьшение количества супрессивных типов клеток, таких как Treg или супрессорные клетки миелоидного происхождения, и ожидается увеличение количества активированных цитотоксических Т-клеток и гранзимных В<sup>+</sup> клеток.

Пример 18. Эффективность NX-43 в модели вирусной инфекции.

Введение.

Как сенсор вирусной нуклеиновой кислоты и модулятор путей MAVS и STING, NLRX1 играет центральную роль в ответе на вирусы. Действительно важность NLRX1 в природном ответе на вирусы была выявлена на моделях вируса гриппа, гепатита С, ВИЧ и герпеса [7, 9, 12, 14]. Хотя сложность общего иммунного ответа различается между вирусами, ясно, что в каждом из них присутствуют NLRX1-опосредованные механизмы с нисходящими эффектами на экспрессию интерферонов типа I и выведение вируса. Предполагается, что ингибирование NLRX1 специфическими ингибиторами активирует иммунный ответ, предотвращает уклонение от иммунного надзора хозяина и подавление иммунитета, и инициирует пути выведения вируса. Для подтверждения эффективности NX-43 можно использовать мышиную модель инфекции вирусом гриппа.

Способы.

Мышиная модель. Мышей C57BL/6 дикого типа в возрасте 8-10 недель можно анестезировать путем ингаляции изофлураном. Мышей можно инфицировать гриппом А (H1N1) интраназально при титре заражения 350 бое/мышь [37]. Мышей можно лечить NX-43 ежедневно в дозах 10, 20 и 40 мг/кг перорально через желудочный зонд или внутривенно путем инъекции в хвостовую вену. Мышей можно взвешивать и оценивать ежедневно в течение 14 дней. Мышей можно подвергнуть эвтаназии на дни 3, 7, 11 и 14 для измерения титров вируса в легких и получения иммунных ответов с помощью экспрессии генов и проточной цитометрии.

Титр вируса. Гомогенаты легких можно получить из мышей, необработанных и обработанных NX-43. Клетки MDCK можно выращивать до конfluence в шестилуночных планшетах. Перед экспозицией клетки можно промыть от среды, содержащей сыворотку. Серийные разведения образца вируса можно проводить в бессывороточной культуральной среде, содержащей фракцию V БСА. Клетки можно инкубировать с 1 мл разведения вируса при 37°C в течение 1 ч. Супернатант можно удалять, а клетки можно промывать. Клетки можно покрывать смесью агара MEM и инкубировать в течение 72 ч. Покрывание можно удалять, а лунки можно окрашивать кристаллическим фиолетовым. Можно подсчитать самое низкое разведение, содержащее не менее 50 бляшек.

Экспрессия Генов. Общую РНК из легкого можно получать с использованием мини-набора Qiagen RNeasy. кДНК можно получать с использованием набора для синтеза кДНК BioRad iScript. Стандартные кривые могут быть получены путем серийного разбавления очищенного продукта из стандартной реакции ПЦР с ДНК-полимеразой Taq с последующей очисткой с использованием набора для очистки Qiagen MinElute PCR. Уровни экспрессии могут быть получены используя количественную ПЦР в реальном времени с супермиксом SybrGreen на термоциклере BioRad CFX96 с последующей нормализацией относительно экспрессии β-актина, как описано ранее [12]. Экспрессию гена можно измерять для ИЛ-6, интерферона-альфа, интерферона-бета, Stat2, Oasla, RIG-I и MAVS.

Проточная цитометрия. Легкие могут быть нарезаны на маленькие кусочки и помещены в буфер RPMI/ФБС/CaCl<sub>2</sub>, содержащий коллагеназу (300 Ед/мл) и ДНКазу (50 Ед/мл) для расщепления. Ткани можно расщеплять в течение от 60 до 90 мин при 37°C при перемешивании. Полученные клеточные суспензии можно фильтровать через сетчатые фильтры 100 мкм, центрифугировали (300×g, 8 мин) и промывали свежим RPMI. Эритроциты можно лизировать гипотоническим лизисом и удалять фильтрованием. Клетки можно промывать и высевать на планшеты для окрашивания для проточной цитометрии. Клетки можно метить смесью внеклеточных (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, NK1.1, CD25, F4/80, CD11b, CD11c, Gr1, CX3CR1, CD64, SiglecF, Ly6C) и внутриклеточных (Tbet, RORγT, FOXP3, ИФНγ, ИЛ6, ИЛ10, ИФНб) антител с последующим окрашиванием живых клеток в 96-луночных планшетах. Данные могут быть получены с использованием проточного цитометра FACS Celesta с программным обеспечением FACSDiva.

Результаты.

Первичная эффективность NX-43 в данной модели инфекции гриппа А может заключаться в оценке титров вирусов. При ингибировании NLRX1 прогнозируется более высокая иммунная активация и интерфероновый ответ, которые, как ожидается, приведут к снижению уровня вируса в легких и обеспечат выведение раньше, чем у мышей, не подвергающихся лечению. Как указано, ожидается, что данное выведение обеспечивается повышенной экспрессией интерферонов 1 типа и воспалительных цитокинов, таких как ИЛ-6. Прогнозируется, что облегчение выведения вируса приведет к более быстрому восстановлению веса после начальной фазы инфекции. Предполагается, что активированный иммунный ответ

приведет к увеличению содержания воспалительных Т-клеток, макрофагов и нейтрофилов в легких во время инфекции.

Пример 19. Эффективность NX-13 при инфекции, вызванной *Clostridium difficile*, в качестве модели бактериальной инфекции.

Введение.

Инфекция, вызванная *Clostridium difficile*, трудно поддается лечению кишечной инфекции в связи с применением антибиотиков, появлением штаммов, устойчивых к антибиотикам, и высокой частотой рецидивов. *C. difficile* можно контролировать путем конкурентного ингибирования, которому способствуют нативные комменсальные штаммы бактерий. Для облегчения повторного роста данных бактерий после приема антибиотиков предполагается, что активация NLRX1 модулирует иммунный ответ в отношении толерогенной среды. Для оценки эффективности NX-13, мы можем использовать мышиную модель инфекции, вызванной *C. difficile*.

Способы.

Мышиная модель. Мышей C57B1/6 дикого типа можно инфицировать *C. difficile* перорально через желудочный зонд. Мышей можно лечить NX-13 ежедневно в дозах 10, 20 и 40 мг/кг перорально через желудочный зонд или внутривенно путем инъекции в хвостовую вену. Мышей можно взвешивать и оценивать ежедневно в течение 12 дней. Мышей можно подвергнуть эвтаназии на дни 4, 8 и 12 для измерения количества *C. difficile* в кишечнике и получения иммунных ответов с помощью экспрессии генов и проточной цитометрии.

Количество *C. difficile*. Гомогенаты фекалий можно получить из мышей, необработанных и обработанных NX-43, и количество *C. difficile* можно определять с использованием стандартных методов.

Экспрессия генов. Общую РНК из кишечника можно получать с использованием мини-набора Qiagen RNeasy. кДНК можно получать с использованием набора для синтеза кДНК BioRad iScript. Стандартные кривые могут быть получены путем серийного разбавления очищенного продукта из стандартной реакции ПЦР с ДНК-полимеразой Taq с последующей очисткой с использованием набора для очистки Qiagen MinElute PCR. Уровни экспрессии могут быть получены используя количественную ПЦР в реальном времени с супермиксом SybrGreen на термоциклере BioRad CFX96 с последующей нормализацией относительно экспрессии β-актина, как описано ранее [12]. Экспрессию гена можно измерять для IL10, IL6, S100A8, S100A9 и DefB1.

Проточная цитометрия. Кишечник может быть нарезан на маленькие кусочки и помещены в буфер RPMI/ФБС/Нерес, содержащий коллагеназу (300 Ед/мл) и ДНКазу (50 Ед/мл) для расщепления. Ткани можно расщеплять в течение 60 мин при 37°C при перемешивании. Полученные клеточные суспензии можно фильтровать через сетчатые фильтры 100 мкм, центрифугировали (300×g, 8 мин) и промывали свежим RPMI.

Эритроциты можно лизировать гипотоническим лизисом и удалять фильтрованием. Клетки можно промывать и высевать на планшеты для окрашивания для проточной цитометрии. Клетки можно метить смесью внеклеточных (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, NK1.1, CD25, F4/80, CD11b, CD11c, Gr1, CX3CR1, CD64, SiglecF, Ly6C) и внутриклеточных (Tbet, RORγT, FOXP3, ИФНγ, IL6, IL10, IL17) антител с последующим окрашиванием живых клеток в 96-луночных планшетах. Данные могут быть получены с использованием проточного цитометра FACS Celesta с программным обеспечением FACSDiva.

Результаты.

Первичная эффективность NX-13 в данной модели инфекции, вызванной *C. difficile*, может заключаться в оценке количества бактерий в кишечнике. При активации NLRX1 прогнозируется более высокая иммунная толерантность и ответы ИЛ-10, которые, как ожидается, приведут к снижению уровня патогенных бактерий в кишечнике за счет ускоренного повторного роста комменсальных штаммов. Благодаря данной повышенной толерантности ожидается более низкий уровень повреждения тканей в результате увеличения ответа Treg по отношению к клеткам Th17 в толстой кишке обработанных мышей. При уменьшении Th17 ожидается снижение количества нейтрофилов в толстой кишке и экспрессии противомикробных пептидов. Ожидается, что иммунологические и микробные изменения, вызванные NX-13, уменьшат потерю веса и показатели активности заболевания, что приведет к менее тяжелому заболеванию и ускорит выздоровление.

Пример 20. Применение NX-13 для лечения диабета 1 типа (СД1).

Введение.

Предполагается, что NX-13 и другие агонисты NLRX1 будут эффективными при лечении диабета 1 типа.

Способы.

Мыши. Мышей NOD можно приобретать у Jackson Laboratory и размещать в вентилируемых стеллажах в специальных условиях, свободных от патогенов. Мышей можно содержать в помещениях для животных. Все экспериментальные протоколы будут одобрены Комитетом по уходу за животными для лабораторных исследований и будут соответствовать или превосходить руководящие принципы Управления Благополучия Лабораторных Животных Национального Института Здравоохранения и политики

санитарно-эпидемиологической службы.

Оценка массы тела и толерантности к глюкозе. Все мыши могут быть определены как нормогликемические (уровень глюкозы в крови натощак ниже 250 мг/дл) и иметь одинаковую массу ( $20 \pm 1,5$  г) до начала исследования. Мышей можно еженедельно взвешивать и осматривать на предмет клинических признаков болезни ослепленными исследователями. После стандартного 12-часового голодания уровень глюкозы можно измерять с помощью глюкометра ACCU-CHEK® (Индианаполис, Индиана). Кровь можно собирать через боковую хвостовую вену и помещать в пробирки для забора капиллярной крови.

Гистопатология. Срезы поджелудочной железы из исследований NOD на мышах можно фиксировать в 10% забуференном нейтральном формалине, позже заливать парафином, а затем делать срезы (5 мкм) и окрашивать H&E для гистологического исследования. Срезы можно оценивать по шкале от 0 до 4 в зависимости от инфильтрации лимфоцитов, повреждения клеток и эрозии тканей, и данные могут быть проанализированы как нормализованный сводный балл.

Статистический анализ. Параметрические данные могут быть проанализированы с использованием дисперсионного анализа, за которым следует метод множественного сравнения Шеффе. Непараметрические данные могут быть проанализированы с помощью U-критерия Манна-Уитни, за которым следует критерий множественного сравнения Данна. Дисперсионный анализ можно выполнять с использованием общей линейной модели SAS, издание 6.0.3 (SAS Institute). Статистическая значимость может быть оценена при  $P \leq 0,05$ .

Результаты.

Предполагается, что NX-13 снижает уровень глюкозы в крови натощак и увеличивает уровень инсулина в мышинной модели диабета 1 типа.

Для определения влияния NX-13 на модуляцию гликемических уровней в мышинной модели СД1 тест на уровень глюкозы в крови натощак можно выполнять на 0, 1, 3, 4, 5, 10 и 11 неделю после начала исследования. Предполагается, что результаты покажут, что мыши, получавшие NX-13, имеют более низкие уровни глюкозы в крови после периода голодания в течение 12 ч. Параллельно с этим уровень инсулина можно оценить на 5 неделе, и ожидается, что результаты покажут, что у мышей, получавших NX-13, значительно повышался уровень инсулина в плазме.

Предполагается, что NX-13 улучшит клинические гистопатологические поражения поджелудочной железы и воспаление в мышинной модели NOD. Для оценки гистопатологических поражений в мышинной модели СД1 поджелудочную железу можно собирать и фиксировать 10% формалином. Затем срезы поджелудочной железы могут быть окрашены H&E и исследованы под микроскопом. Предполагается, что результаты покажут, что лечение NX-13 значительно снижает клинические гистопатологические поражения в поджелудочной железе у мышей по сравнению с мышами, получавшими носитель.

#### Список литературы

1. Davis, B.K., et al., *Emerging significance of NLRs in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2014. **20**(12): p. 2412-32.
2. Arnoult, D., et al., *An N-terminal addressing sequence targets NLRX1 to the mitochondrial matrix*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 17): p. 3161-8.
3. Leber, A., et al., *NLRX1 Regulates Effector and Metabolic Functions of CD4<sup>+</sup> T Cells*. J Immunol, 2017.
4. Leber, A., et al., *NLRX1 Modulates Immunometabolic Mechanisms Controlling the Host-Gut Microbiota Interactions during Inflammatory Bowel Disease*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 363
5. Lu, P., et al., *Modeling-Enabled Characterization of Novel NLRX1 Ligands*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0145420.



6. Soares, F., et al., *The mitochondrial protein NLRX1 controls the balance between extrinsic and intrinsic apoptosis*. J Biol Chem, 2014. **289**(28): p. 19317-30.
7. Allen, I.C., et al., *NLRX1 protein attenuates inflammatory responses to infection by interfering with the RIG-I-MAVS and TRAF6-NF-kappaB signaling pathways*. Immunity, 2011. **34**(6): p. 854-65.
8. Feng, H., et al., *NLRX1 promotes immediate IRF1-directed antiviral responses by limiting dsRNA-activated translational inhibition mediated by PKR*. Nat Immunol, 2017. **18**(12): p. 1299-1309.
9. Guo, H., et al., *NLRX1 Sequesters STING to Negatively Regulate the Interferon Response, Thereby Facilitating the Replication of HIV-1 and DNA Viruses*. Cell Host Microbe, 2016. **19**(4): p. 515-528.
10. Jaworska, J., et al., *NLRX1 prevents mitochondrial induced apoptosis and enhances macrophage antiviral immunity by interacting with influenza virus PB1-F2 protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(20): p. E2110-9.
11. Kim, J.H., et al., *FAS-associated factor-1 positively regulates type I interferon response to RNA virus infection by targeting NLRX1*. PLoS Pathog, 2017. **13**(5): p. e1006398.
12. Ma, Z., et al., *NLRX1 negatively modulates type I IFN to facilitate KSHV reactivation from latency*. PLoS Pathog, 2017. **13**(5): p. e1006350.
13. Moore, C.B., et al., *NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity*. Nature, 2008. **451**(7178): p. 573-7.
14. Qin, Y., et al., *NLRX1 mediates MAVS degradation to attenuate hepatitis C virus-induced innate immune response through PCBP2*. J Virol, 2017.
15. Philipson, C.W., et al., *Modeling the Regulatory Mechanisms by Which NLRX1 Modulates Innate Immune Responses to Helicobacter pylori Infection*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0137839.
16. Kale, S.D., et al., *Modulation of Immune Signaling and Metabolism Highlights Host and Fungal Transcriptional Responses in Mouse Models of Invasive Pulmonary Aspergillosis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 17096.
17. Coutermarsh-Ott, S., et al., *NLRX1 suppresses tumorigenesis and attenuates histiocytic sarcoma through the negative regulation of NF-kappaB signaling*. Oncotarget, 2016. **7**(22): p. 33096-110.
18. Koblansky, A.A., et al., *The Innate Immune Receptor NLRX1 Functions as a Tumor Suppressor by Reducing Colon Tumorigenesis and Key Tumor-Promoting Signals*. Cell Rep, 2016. **14**(11): p. 2562-75.
19. Lei, Y., et al., *EGFR-targeted mAb therapy modulates autophagy in head and neck squamous cell carcinoma through NLRX1-TUFM protein complex*. Oncogene, 2016. **35**(36): p. 4698-707.
20. Singh, K., et al., *NLRX1 acts as tumor suppressor by regulating TNF-alpha induced apoptosis and metabolism in cancer cells*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1853**(5): p. 1073-86.
21. Tattoli, I., et al., *NLRX1 Acts as an Epithelial-Intrinsic Tumor Suppressor through the*

*Modulation of TNF-Mediated Proliferation.* Cell Rep, 2016. **14**(11): p. 2576-86.

22. Kors, L., et al., *Deletion of NLRX1 increases fatty acid metabolism and prevents diet-induced hepatic steatosis and metabolic syndrome.* Biochim Biophys Acta, 2018. **1864**(5 Pt A): p. 1883-1895.

23. Wang, Y.G., et al., *The involvement of NLRX1 and NLRP3 in the development of nonalcoholic steatohepatitis in mice.* J Chin Med Assoc, 2013. **76**(12): p. 686-92.

24. Costford, S.R., et al., *Male Mice Lacking NLRX1 Are Partially Protected From High-Fat Diet-Induced Hyperglycemia.* J Endocr Soc, 2018. **2**(4): p. 336-347.

25. Theus, M.H., et al., *Loss of NLRX1 Exacerbates Neural Tissue Damage and NF-kappaB Signaling following Brain Injury.* J Immunol, 2017. **199**(10): p. 3547-3558.

26. Li, H., et al., *NLRX1 attenuates apoptosis and inflammatory responses in myocardial ischemia by inhibiting MAVS-dependent NLRP3 inflammasome activation.* Mol Immunol, 2016. **76**: p. 90-7.

27. Kang, M.J., et al., *Suppression of NLRX1 in chronic obstructive pulmonary disease.* J Clin Invest, 2015. **125**(6): p. 2458-62.

28. Eitas, T.K., et al., *The nucleotide-binding leucine-rich repeat (NLR) family member NLRX1 mediates protection against experimental autoimmune encephalomyelitis and represses macrophage/microglia-induced inflammation.* J Biol Chem, 2014. **289**(7): p. 4173-9.

29. Hong, M., S.I. Yoon, and I.A. Wilson, *Structure and functional characterization of the RNA-binding element of the NLRX1 innate immune modulator.* Immunity, 2012. **36**(3): p. 337-47.

30. Finn, O.J., *Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer.* Ann Oncol, 2012. **23 Suppl 8**: p. viii6-9.

31. Abreu, M.T., *Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function.* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 131-44.

32. Baumgart, D.C. and W.J. Sandborn, *Crohn's disease.* Lancet, 2012. **380**(9853): p. 1590-605.

33. Sartor, R.B., *Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis.* Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2006. **3**(7): p. 390-407.

34. Haarberg, K.M., et al., *Orally administered extract from *Prunella vulgaris* attenuates spontaneous colitis in *mdr1a*(-/-) mice.* World J Gastrointest Pharmacol Ther, 2015. **6**(4): p. 223-37.

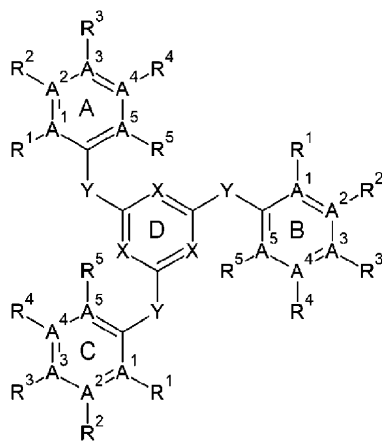
35. Leber, A., et al., *Activation of LANCL2 by BT-11 Ameliorates IBD by Supporting Regulatory T Cell Stability Through Immunometabolic Mechanisms.* Inflamm Bowel Dis, 2018.

36. Schwab, M., et al., *Association between the C3435T MDRI gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis.* Gastroenterology, 2003. **124**(1): p. 26-33.

37. Leber, A., et al., *Lanthionine Synthetase C-Like 2 Modulates Immune Responses to Influenza Virus Infection.* Front Immunol, 2017. **8**: p. 178.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы Z, имеющее кольцо А, кольцо В, кольцо С и кольцо D, или его фармацевтически приемлемая соль, где  
Z представляет собой



X в каждом случае представляет собой CH;

Y в каждом случае независимо выбран из группы, включающей  $\text{NR}^6$ , O, S,  $\text{CH}_2$  и  $\text{C}=\text{O}$ , при условии, что Y между кольцом D и кольцом A представляет собой O;

$\text{A}^1, \text{A}^2, \text{A}^3, \text{A}^4$  и  $\text{A}^5$  в каждом случае независимо выбраны из группы, включающей N и C, при условии, что каждый из  $\text{A}^1, \text{A}^2, \text{A}^3$  и  $\text{A}^4$  в кольце A представляет собой C и  $\text{A}^5$  в кольце A представляет собой N;

$\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4, \text{R}^5$  и  $\text{R}^6$ , когда они присутствуют, в каждом случае независимо выбраны из группы, включающей водород, гидроксигруппу, аминогруппу и  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкил, при условии, что любой из  $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4$  и/или  $\text{R}^5$  в данном кольце отсутствует, когда  $\text{A}^1, \text{A}^2, \text{A}^3, \text{A}^4$  и/или  $\text{A}^5$  в данном кольце, соответственно, представляет собой N.

2. Соединение по п.1, где по меньшей мере один из  $\text{R}^1$  и  $\text{R}^4$  в кольце A выбран из группы, состоящей из гидроксигруппы, аминогруппы и  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкила.

3. Соединение по п.1, где  $\text{R}^4$  в кольце A выбран из группы, состоящей из гидроксигруппы, аминогруппы и  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкила.

4. Соединение по п.3, где  $\text{R}^4$  в кольце A представляет собой  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкил.

5. Соединение по п.4, где  $\text{R}^1, \text{R}^2$  и  $\text{R}^3$  в кольце A представляет собой водород.

6. Соединение по п.1, где

каждый Y представляет собой O;

$\text{A}^1, \text{A}^2, \text{A}^3$  и  $\text{A}^4$  в кольце B представляют собой C; и

$\text{A}^5$  в кольце B представляет собой N.

7. Соединение по п.6, где по меньшей мере один из  $\text{R}^1$  и  $\text{R}^4$  в кольце A и по меньшей мере один из  $\text{R}^1$  и  $\text{R}^4$  в кольце B выбран из группы, состоящей из гидроксигруппы, аминогруппы и  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкила.

8. Соединение по п.6, где  $\text{R}^4$  в каждом кольце A и в кольце B выбран из группы, состоящей из гидроксигруппы, аминогруппы и  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкила.

9. Соединение по п.8, где  $\text{R}^4$  в кольце A и  $\text{R}^4$  в кольце B все независимо представляют собой  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкил.

10. Соединение по п.9, где  $\text{R}^1, \text{R}^2$  и  $\text{R}^3$  в каждом кольце A и в кольце B представляют собой водород.

11. Соединение по п.1, где

каждый Y представляет собой O;

каждый  $\text{A}^1$ , каждый  $\text{A}^2$ , каждый  $\text{A}^3$  и каждый  $\text{A}^4$  представляет собой C; и

каждый  $\text{A}^5$  представляет собой N.

12. Соединение по п.11, где каждый  $\text{R}^4$  выбран из группы, состоящей из гидроксигруппы, аминогруппы и  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкила.

13. Соединение по п.12, где каждый  $\text{R}^4$  независимо представляет собой  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкил.

14. Соединение по п.13, где каждый  $\text{R}^1, \text{R}^2$  и  $\text{R}^3$  представляет собой водород.

15. Соединение по п.1, являющееся симметричным.

16. Соединение по п.1, являющееся асимметричным.

17. Соединение по п.1, где

каждый  $\text{R}^1$ , если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода и  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкила;

каждый  $\text{R}^2$ , если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода и  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкила;

каждый  $\text{R}^3$ , если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода, гидроксигруппы и аминогруппы;

каждый  $\text{R}^4$ , если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода, гидроксигруппы,  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкила; и

каждый  $\text{R}^5$ , если он присутствует, представляет собой водород.

18. Соединение по п.1, где

каждый  $\text{R}^1$ , если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода и  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкила;

$\text{R}^2$  на каждом кольце A и кольце B, если он присутствует, представляет собой водород;

$\text{R}^2$  в кольце C, если он присутствует, выбран из группы, состоящей из водорода и  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкила;

$\text{R}^3$  на каждом кольце A и кольце B, если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода, гидроксигруппы и аминогруппы;

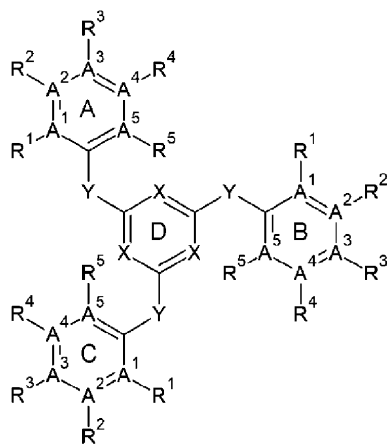
$\text{R}^3$  на кольце C, если он присутствует, выбран из группы, состоящей из водорода и аминогруппы;

$\text{R}^4$  в каждом кольце A и кольце B, если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода и  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкила;

$\text{R}^4$  в кольце C, если он присутствует, выбран из группы, состоящей из водорода, гидроксигруппы и  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкила; и

$\text{R}^5$  на кольце C, если он присутствует, представляет собой водород.

19. Соединение формулы Z, имеющее кольцо A, кольцо B, кольцо C и кольцо D, или его фармацевтически приемлемая соль, где Z представляет собой



X в каждом случае представляет собой CH;  
Y в каждом случае представляет собой O;  
A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup> и A<sup>4</sup> в каждом случае независимо выбраны из группы, состоящей из N и C, при условии, что по меньшей мере один из A<sup>1</sup> и A<sup>3</sup> на кольце A представляет собой C, а A<sup>2</sup> на кольце A представляет собой C;

A<sup>5</sup> в каждом случае представляет собой N;

R<sup>5</sup> в каждом случае отсутствует;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup>, когда они присутствуют, в каждом случае независимо выбраны из группы, включающей водород, гидроксигруппу, галоген, аминогруппу и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, при условии, что любой из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и/или R<sup>4</sup> в данном кольце отсутствует, когда A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup> и/или A<sup>4</sup> в данном кольце, соответственно, представляет собой N.

20. Соединение по п.19, где

каждый R<sup>1</sup>, если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила;

каждый R<sup>2</sup>, если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила;

каждый R<sup>3</sup>, если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода, гидроксигруппы и аминогруппы; и

каждый R<sup>4</sup>, если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода, гидроксигруппы, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила.

21. Соединение по п.19, где

каждый R<sup>1</sup>, если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила;

R<sup>2</sup> на каждом кольце A и кольце B, если он присутствует, представляет собой водород;

R<sup>2</sup> в кольце C, если он присутствует, выбран из группы, состоящей из водорода и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила;

R<sup>3</sup> на каждом кольце A и кольце B, если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода, гидроксигруппы и аминогруппы;

R<sup>3</sup> на кольце C, если он присутствует, выбран из группы, состоящей из водорода и аминогруппы;

R<sup>4</sup> в каждом кольце A и кольце B, если он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из водорода и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила; и

R<sup>4</sup> в кольце C, если он присутствует, выбран из группы, состоящей из водорода, гидроксигруппы и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила.

22. Способ лечения состояния у животного, включающий введение эффективного количества соединения по любому из пп.1-21 животному, где состояние представляет собой воспалительное желудочно-кишечное заболевание или злокачественное новообразование.

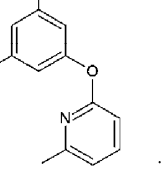
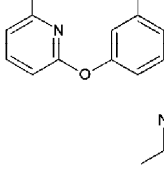
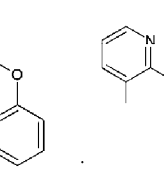
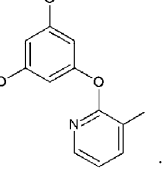
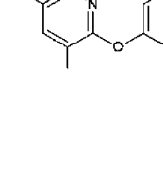
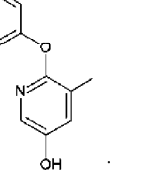
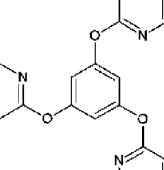
23. Способ по п.22, где состояние представляет собой воспалительное желудочно-кишечное заболевание.

24. Способ по п.22, отличающийся тем, что указанное состояние представляет собой воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта и представляет собой воспалительное заболевание кишечника.

25. Способ по п.24, отличающийся тем, что указанное воспалительное заболевание кишечника представляет собой язвенный колит.

26. Способ по п.24, отличающийся тем, что указанное воспалительное заболевание кишечника представляет собой болезнь Крона.

27. Способ по п.22, отличающийся тем, что указанное состояние представляет собой злокачественное новообразование, где указанное злокачественное новообразование представляет собой колоректаль-

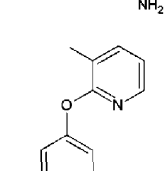
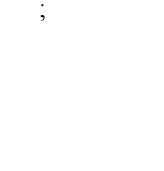

  

  

  

  

  

  

  

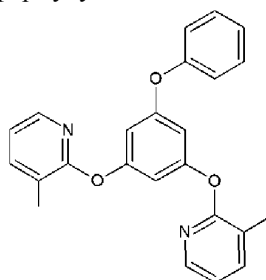
  


29. Соединение по п.28, имеющее формулу

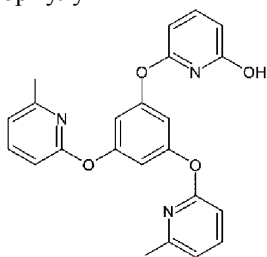
Cc1ccc(Oc2ccc(Oc3ccc(N)cc3)cc2)cc1

30. Соединение по п.28, имеющее формулу



или его фармацевтически приемлемая соль.

31. Соединение по п.28, имеющее формулу

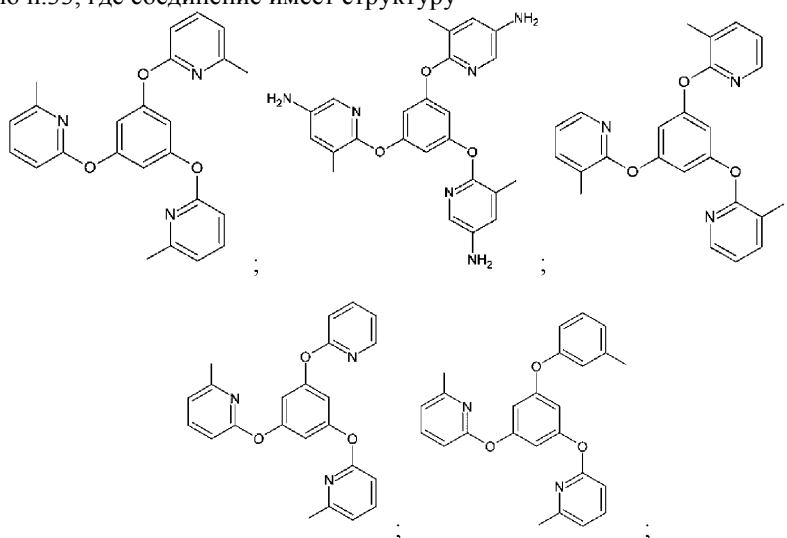


или его фармацевтически приемлемая соль.

32. Способ лечения состояния у животного, включающий введение эффективного количества соединения по п.28 данному животному, где указанное состояние представляет собой воспалительное желудочно-кишечное заболевание или злокачественное новообразование.

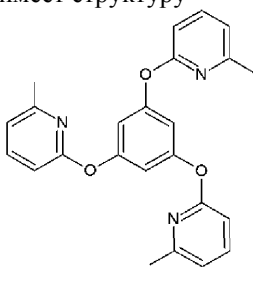
33. Способ по п.32, где состояние представляет собой воспалительное желудочно-кишечное заболевание.

34. Способ по п.33, где соединение имеет структуру



или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленного.

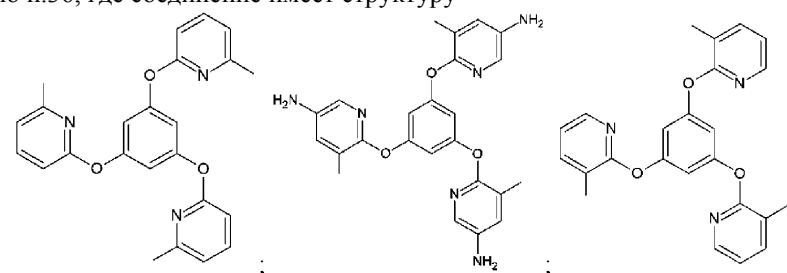
35. Способ по п.33, где соединение имеет структуру

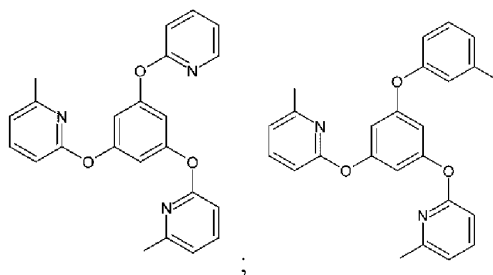


или его фармацевтически приемлемая соль.

36. Способ по п.32, отличающийся тем, что указанное состояние представляет собой воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта и представляет собой воспалительное заболевание кишечника.

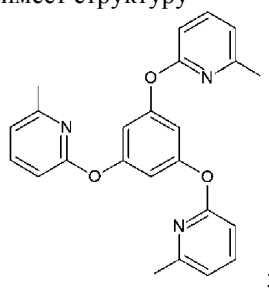
37. Способ по п.36, где соединение имеет структуру





или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленного.

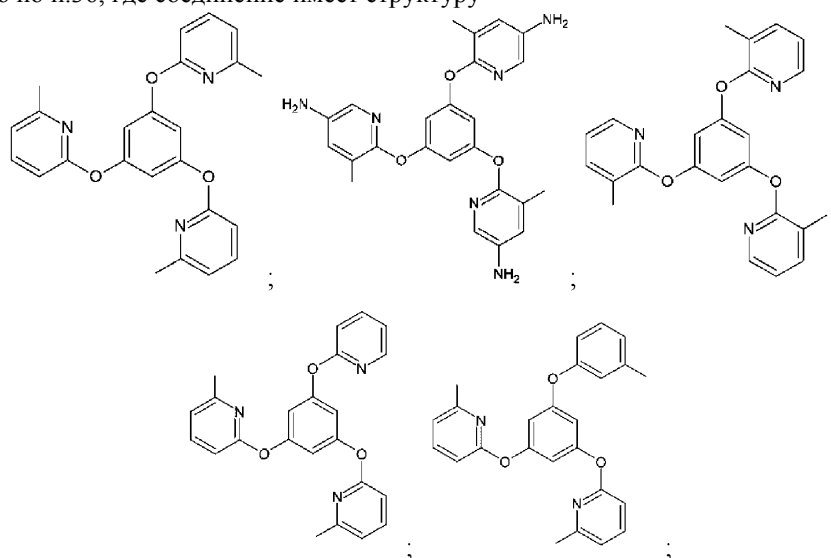
38. Способ по п.36, где соединение имеет структуру



или его фармацевтически приемлемая соль.

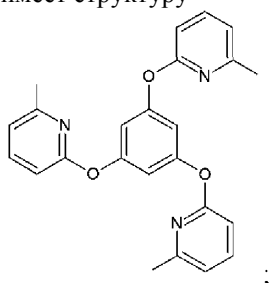
39. Способ по п.36, отличающийся тем, что указанное воспалительное заболевание кишечника представляет собой язвенный колит.

40. Способ по п.36, где соединение имеет структуру



или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленного.

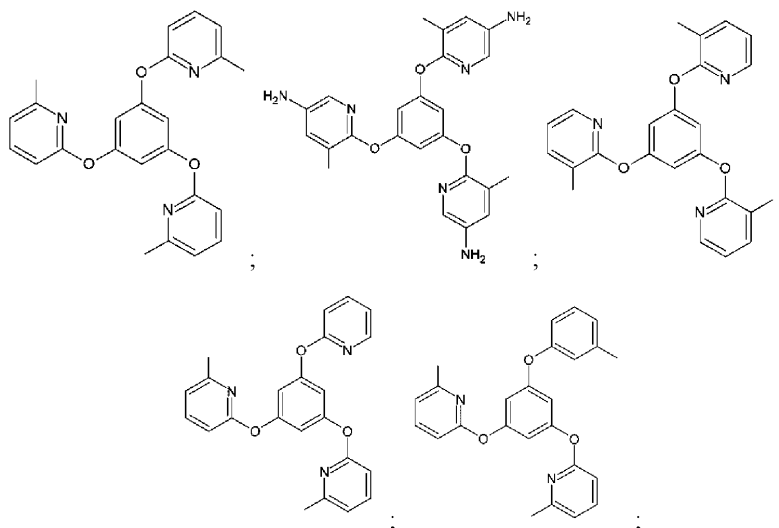
41. Способ по п.39, где соединение имеет структуру



или его фармацевтически приемлемая соль.

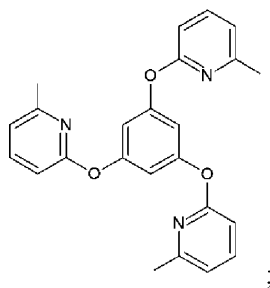
42. Способ по п.36, отличающийся тем, что указанное воспалительное заболевание кишечника представляет собой болезнь Крона.

43. Способ по п.42, где соединение имеет структуру



или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленного.

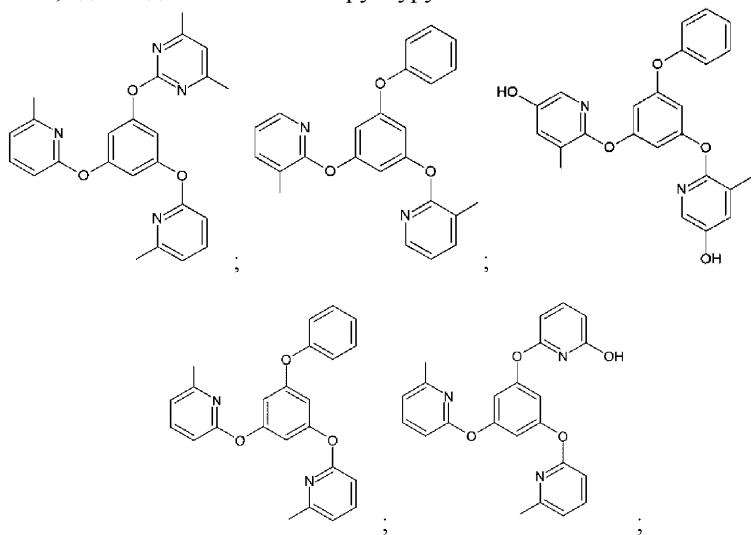
44. Способ по п.42, где соединение имеет структуру



или его фармацевтически приемлемая соль.

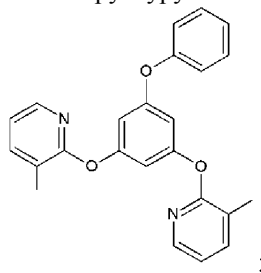
45. Способ по п.32, где состояние представляет собой злокачественное новообразование.

46. Способ по п.45, где соединение имеет структуру



или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленного.

47. Способ по п.45, где соединение имеет структуру

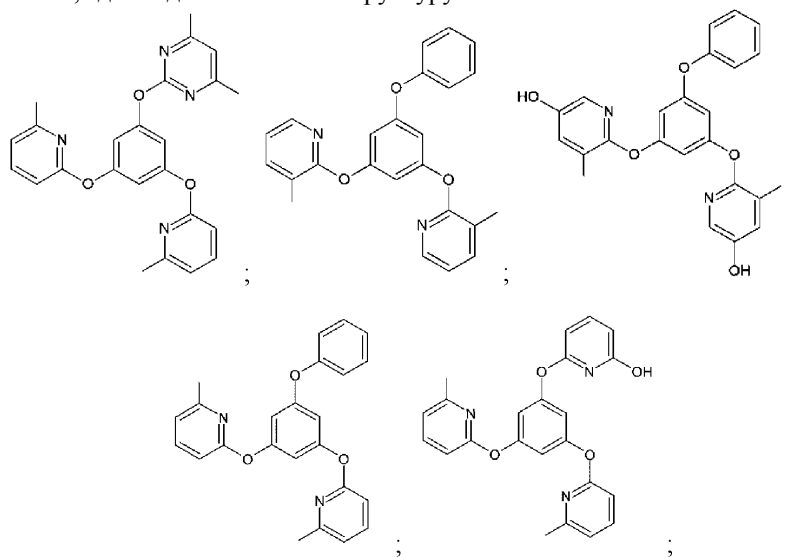


или его фармацевтически приемлемая соль.



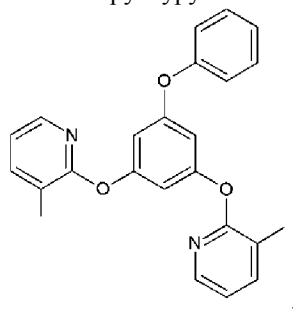
48. Способ по п.32, отличающийся тем, что указанное состояние представляет собой злокачественное новообразование, где указанное злокачественное новообразование представляет собой колоректальный рак.

49. Способ по п.48, где соединение имеет структуру



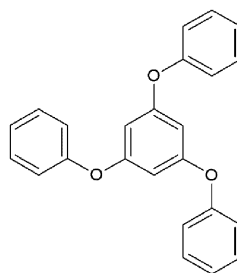
или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленного.

50. Способ по п.48, где соединение имеет структуру



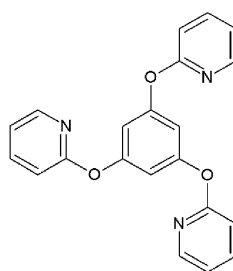
или его фармацевтически приемлемая соль.

**NX-5**



Фиг. 1A

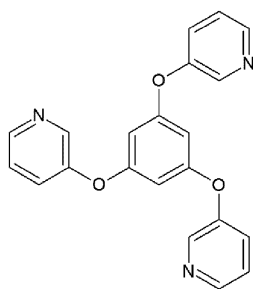
**NX-8**



Фиг. 1B

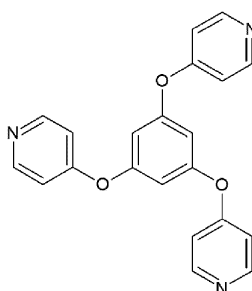
045397

**NX-9**



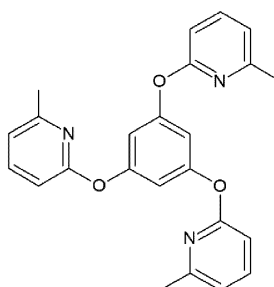
Фиг. 1С

**NX-10**



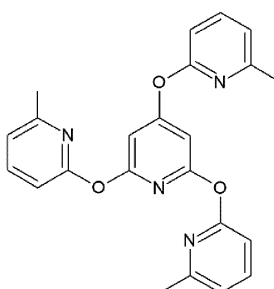
Фиг. 1D

**NX-13**



Фиг. 1E

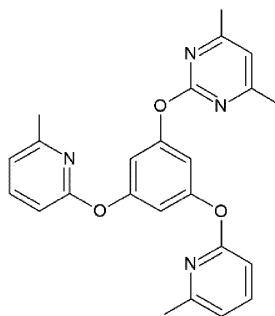
**NX-35**



Фиг. 1F

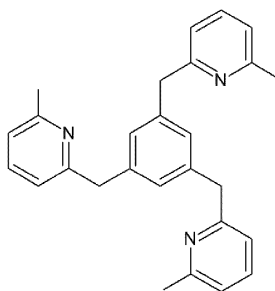
045397

**NX-37**



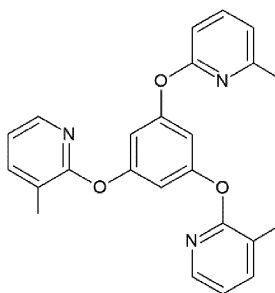
Фиг. 1G

**NX-38**



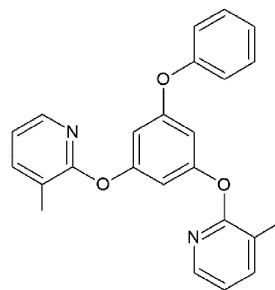
Фиг. 1H

**NX-41**



Фиг. 1I

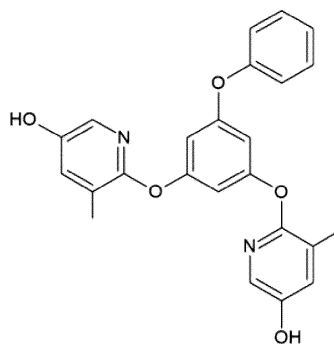
**NX-43**



Фиг. 1J

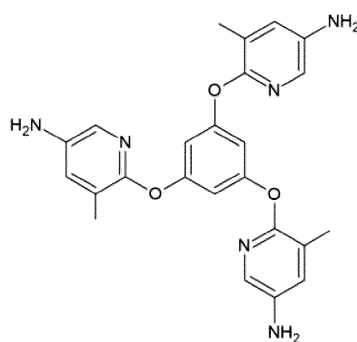
045397

**NX-44**



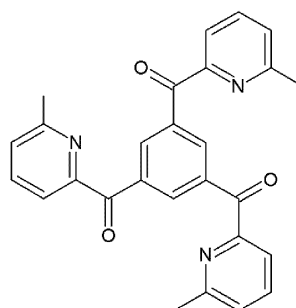
Фиг. 1K

**NX-45**



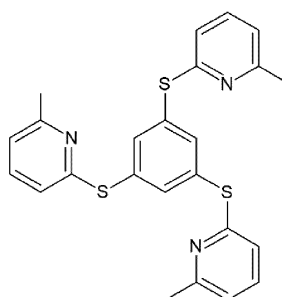
Фиг. 1L

**NX-46**



Фиг. 1M

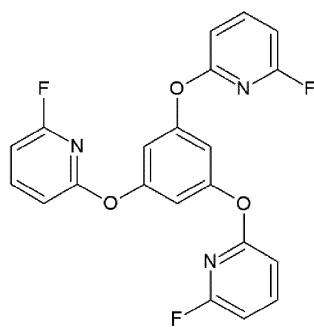
**NX-48**



Фиг. 1N

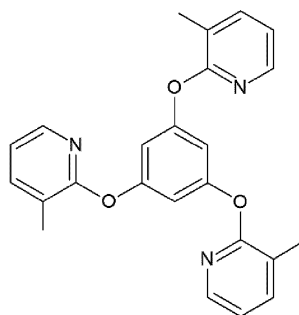
045397

**NX-49**



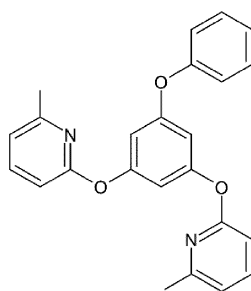
Фиг. 1O

**NX-50**



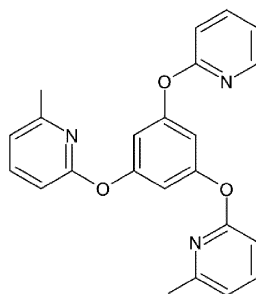
Фиг. 1P

**NX-53**



Фиг. 1Q

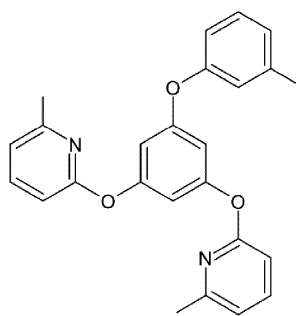
**NX-54**



Фиг. 1R

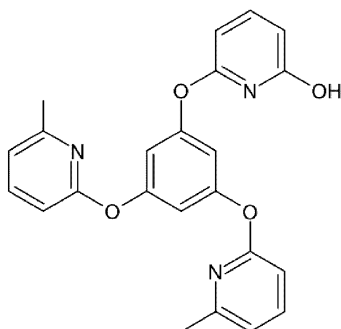
045397

**NX-55**



Фиг. 1S

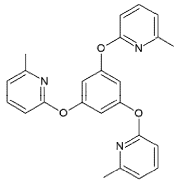
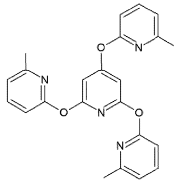
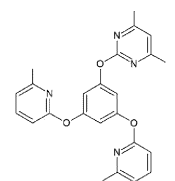
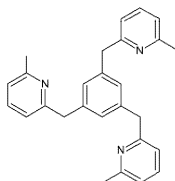
**NX-56**



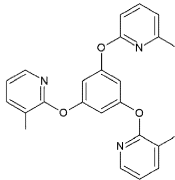
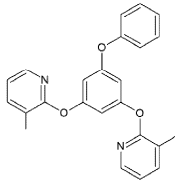
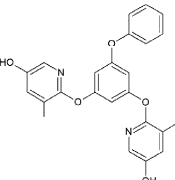
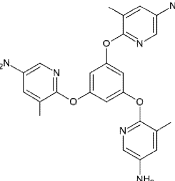
Фиг 1T

| Идентификатор | Формула | Аффинность<br>(ккал/моль) |
|---------------|---------|---------------------------|
| NX-5          |         | -8.9                      |
| NX-8          |         | -9.2                      |
| NX-9          |         | -9.1                      |
| NX-10         |         | -9.1                      |

Фиг. 2A

| Идентификатор | Формула                                                                            | Аффинность<br>(ккал/моль) |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| NX-13         |   | -10.6                     |
| NX-35         |   | -10.6                     |
| NX-37         |   | -11.0                     |
| NX-38         |  | -9.7                      |

Фиг. 2В

| Идентификатор | Формула                                                                             | Аффинность<br>(ккал/моль) |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| NX-41         |  | -11.0                     |
| NX-43         |  | -11.6                     |
| NX-44         |  | -11.6                     |
| NX-45         |  | -10.0                     |

Фиг. 2С

| Идентификатор | Формула | Аффинность<br>(ккал/моль) |
|---------------|---------|---------------------------|
| NX-46         |         | -10.4                     |
| NX-48         |         | -10.5                     |
| NX-49         |         | -10.2                     |
| NX-50         |         | -11.7                     |

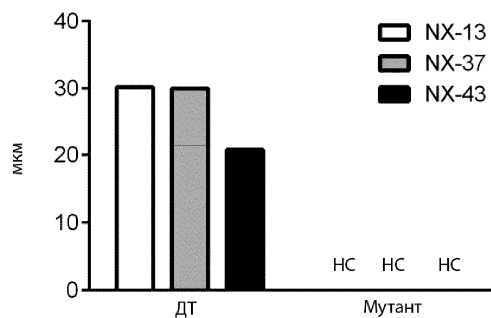
Фиг. 2D

| Идентификатор | Формула | Аффинность<br>(ккал/моль) |
|---------------|---------|---------------------------|
| NX-53         |         | -10.1                     |
| NX-54         |         | -10.2                     |
| NX-55         |         | -10.6                     |
| NX-56         |         | -9.9                      |

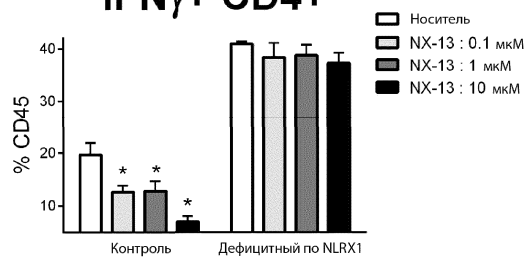
Фиг. 2E



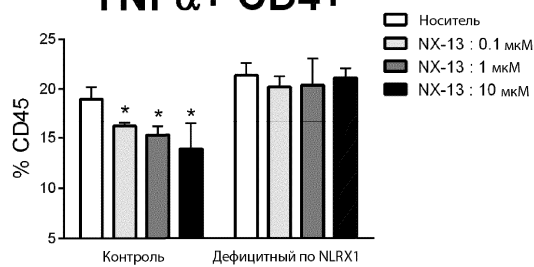
## Константа диссоциации в стационарном состоянии



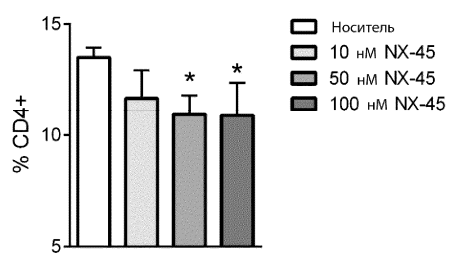
Фиг. 3

IFN $\gamma$ + CD4+

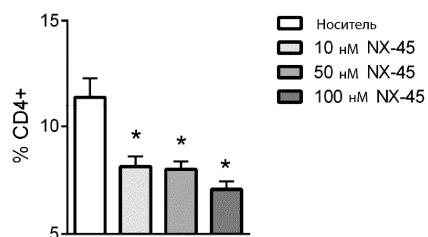
Фиг. 4А

TNF $\alpha$ + CD4+

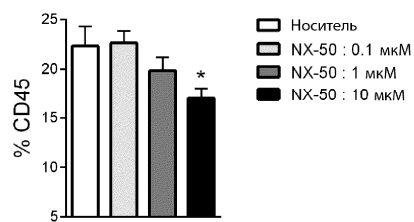
Фиг. 4В

IFN $\gamma$ +

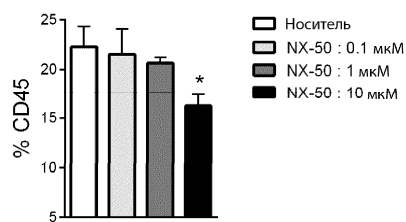
Фиг. 5А

TNF $\alpha$ +

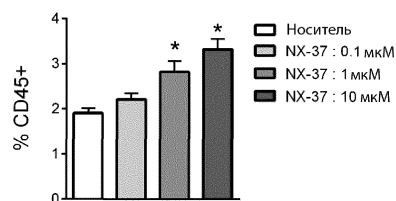
Фиг. 5В

**IFN $\gamma$ + CD4+**

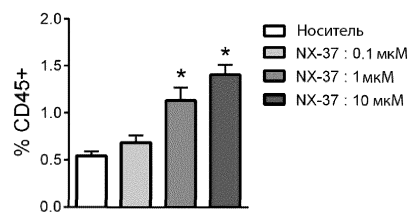
Фиг. 5C

**TNF $\alpha$ + CD4+**

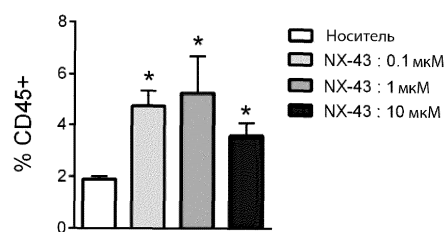
Фиг. 5D

**IFN $\gamma$ + CD4+**

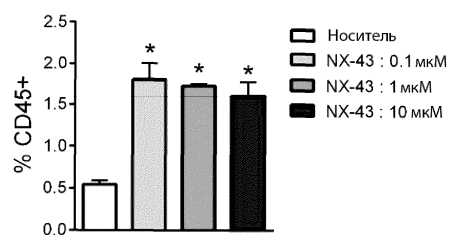
Фиг. 6A

**TNF $\alpha$ + CD4+**

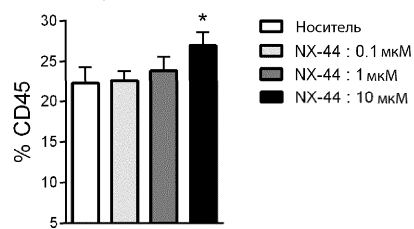
Фиг. 6B

**IFN $\gamma$ + CD4+**

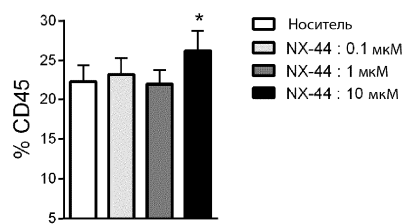
Фиг. 6C

**TNF $\alpha$ + CD4+**

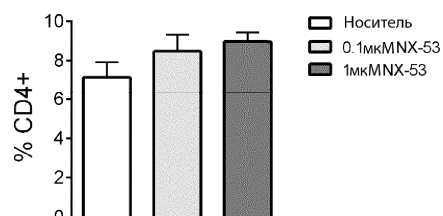
Фиг. 6D

**IFN $\gamma$ + CD4+**

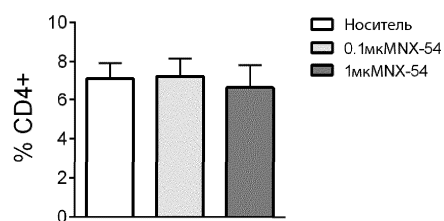
Фиг. 6E

**TNF $\alpha$ + CD4+**

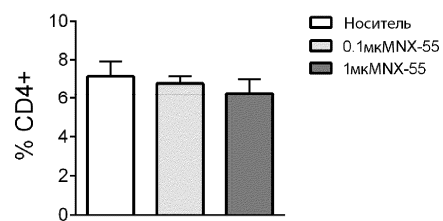
Фиг. 6F

**IFN $\gamma$ +**

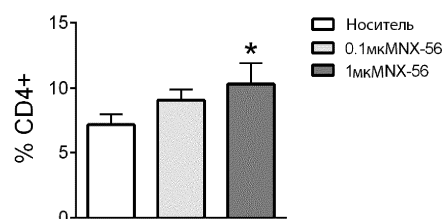
Фиг. 6G

**IFN $\gamma$ +**

Фиг. 6H

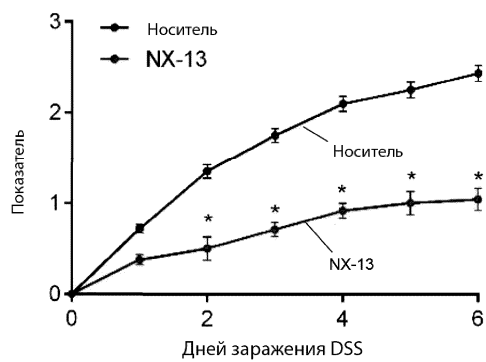
IFN $\gamma$ +

Фиг. 6I

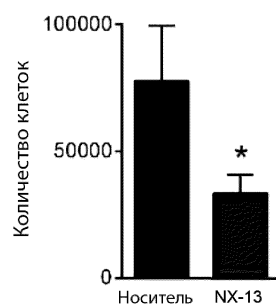
IFN $\gamma$ +

Фиг. 6J

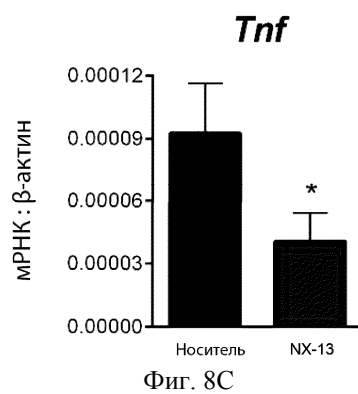
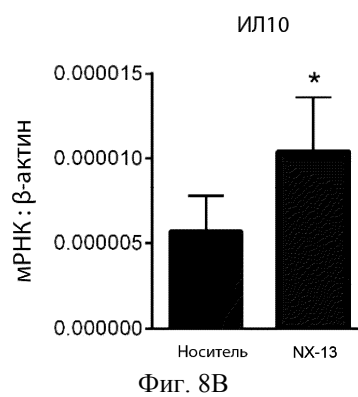
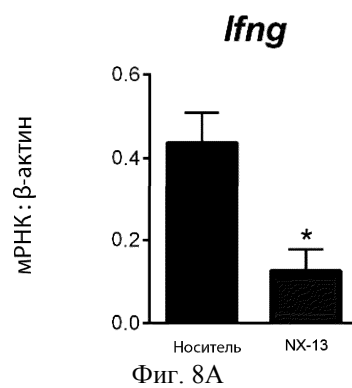
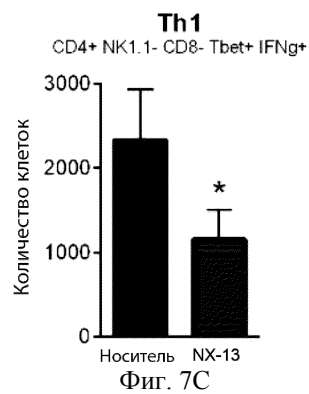
Индекс Активности Заболевания



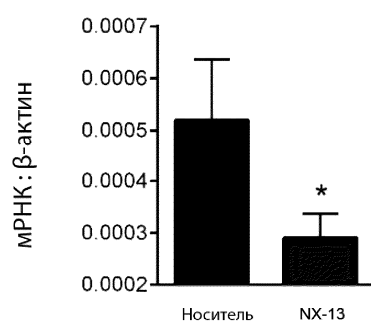
Фиг. 7A

Нейтрофилы  
Gr1<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>

Фиг. 7B

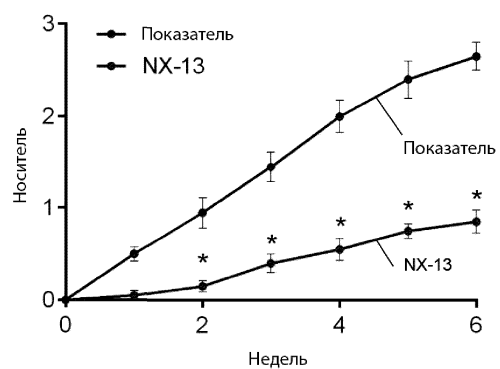


ИЛ17



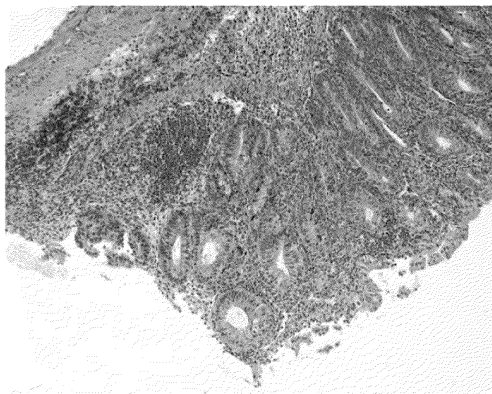
Фиг. 8D

Индекс Активности Заболевания



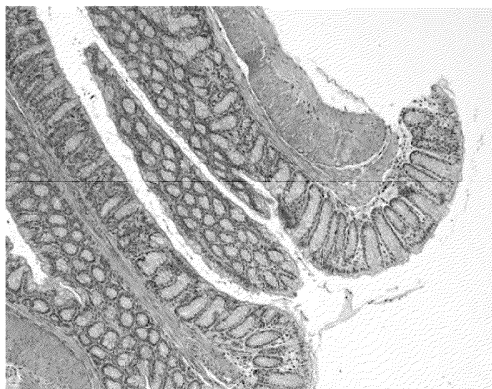
Фиг. 9

Носитель

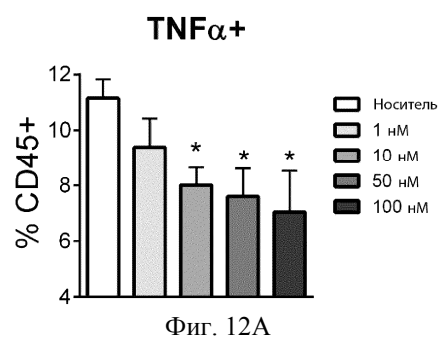
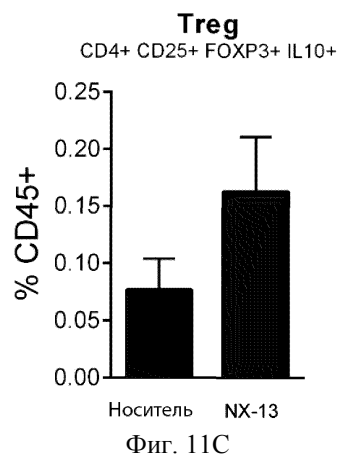
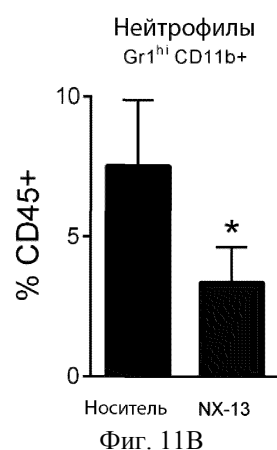
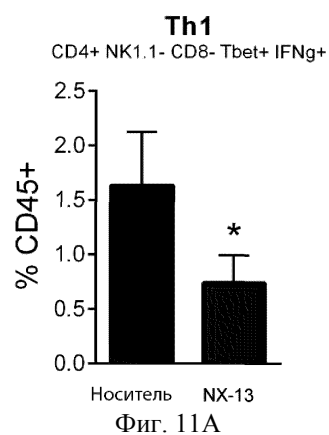


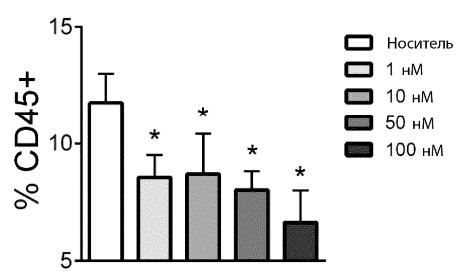
Фиг. 10А

NX-13

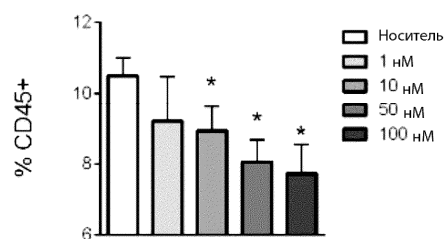


Фиг. 10В

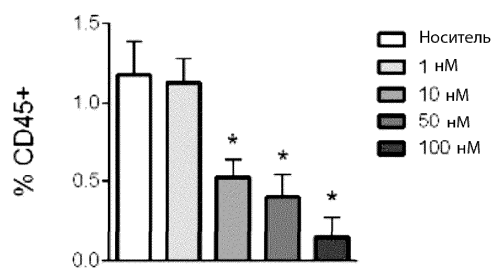


**IFN $\gamma$ +**

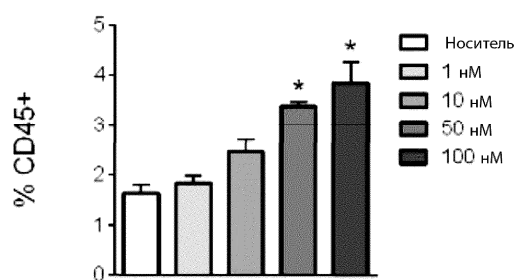
Фиг. 12В

**TNF $\alpha$ +**

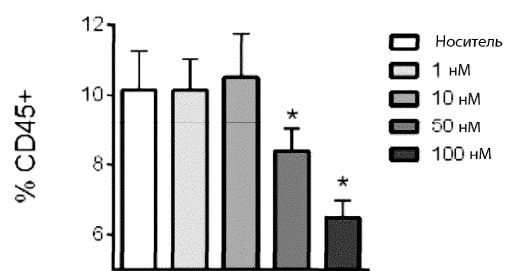
Фиг. 13А

**ИЛ4+**

Фиг. 13В

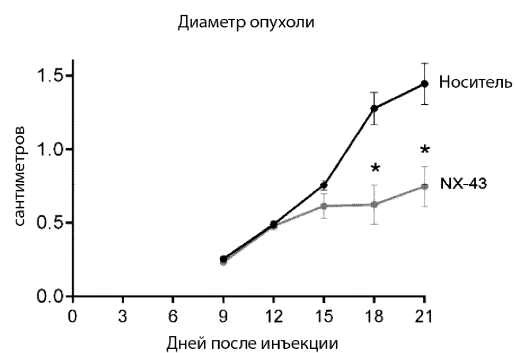
**ИЛ10+**

Фиг. 13С

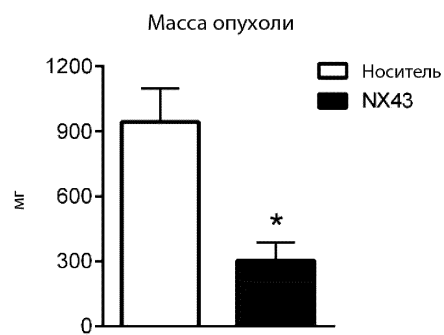
**IFN $\gamma$ +**

Фиг. 13D

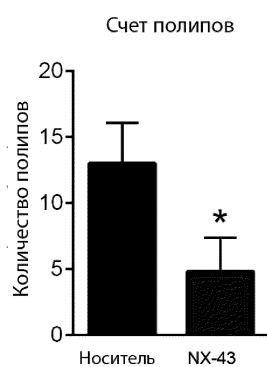




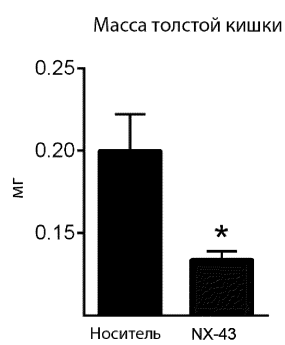
Фиг. 14А



Фиг. 14В



Фиг. 15А



Фиг. 15В