(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292964 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.03

(22) Дата подачи заявки
2021.04.14

(51) Int. Cl. ***A61K 31/553*** (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(54) 3-АЗА-БИЦИКЛО[3.2.1]ОКТАНКАРБОНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ ВОСПАЛЕНИЯ

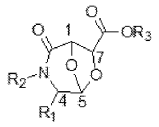
(31) **102020000008125**
(32) **2020.04.16**
(33) **IT**
(86) **PCT/IB2021/053062**
(87) **WO 2021/209910 2021.10.21**

(71) Заявитель:
МИНЕРВА С.Р.Л.; МИМЕТЕК С.Р.Л. (IT)

(72) Изобретатель:
Гуарна Антонио, Кастроново Джузеппе, Тантурли Микеле (IT)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение описывает 3-аза-бицикло[3.2.1]октановые кислоты общей формулы (I), их соли и сложные эфиры для применения в качестве активаторов ADAR1 при лечении заболеваний, связанных с острыми или хроническими воспалениями, инфекционных или неинфекционных, характеризующихся цитокиновым штормом и/или неконтролируемым иммунным ответом.



202292964 A1

202292964 A1

3-АЗА-БИЦИКЛО[3.2.1]ОКТАН-КАРБОНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ ВОСПАЛЕНИЯ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области соединений 3-аза-бицикло[3.2.1]октан-карбоновых кислот и их производных для применения в лечении острых или хронических воспалений, инфекционных или неинфекционных, характеризующихся цитокиновым штормом и/или неконтролируемым иммунным ответом.

Предшествующий уровень техники

Воспаление является ответом иммунной системы на вредные раздражители, такие как патогены (вирусы, бактерии, грибы), токсические химико-биологические вещества, некроз клеток (инфаркт миокарда, раны тканей) и радиация. Оно представляет собой защитный механизм, который действует путем удаления вредных раздражителей и в то же время стимуляции процесса заживления. Обычно во время воспалительных реакций клеточные и молекулярные процессы строго регулируются и направлены на минимизацию повреждения. Этот процесс смягчения способствует восстановлению тканевого гомеостаза и быстрому разрешению воспаления, которое в данном случае определяется как острое воспаление. Однако, когда регуляция воспалительного процесса не удается, воспаление становится неконтролируемым и может стать хроническим, что приводит к ряду тяжелых воспалительных заболеваний или к очень опасным синдромам, таким как так называемый «цитокиновый шторм» (синдром цитокинового шторма или СЦШ). [Behrens and Koretzky, arthritis & rheumatology 2017]. Независимо от этиологии при воспалении активируется каскад биохимических сигналов, необходимых для устранения повреждающего раздражителя и заживления поврежденных тканей. В частности, лейкоциты, которые, в свою очередь, продуцируют воспалительные цитокины, возвращаются из общего кровотока в места повреждения. Как правило, воспалительная реакция состоит из серии скоординированных событий, включающих как резидентные тканевые клетки, так и те клетки, которые возвращаются из крови. Хотя тип событий, запускаемых во время воспаления, зависит от природы вредного стимула и от типа пораженной ткани/органа, все они имеют общие этапы и механизмы: (1) рецепторы клеточной поверхности распознают вредные раздражители; (2) активация путей воспаления; (3) выброс маркеров воспаления; (4) рекрутинг воспалительных клеток; (5) разрешение воспалительного процесса. Эта последняя часть имеет фундаментальное

значение, поскольку она предупреждает переход от острой стадии воспаления к хронической, предотвращая длительную и неконтролируемую реакцию, которая может привести к дальнейшим повреждениям в дополнение к вызванным первоначальным патогенным стимулом. Очевидно, что хроническое воспаление может возникать всякий раз, когда первоначальный вредный раздражитель не устраняется. Обычно воспаление, острое или хроническое, является локализованным, но в некоторых случаях оно может стать системным и неконтролируемым, приводя к СЦШ [Gilroy and De Maeyer, Seminars in Immunology 2015]. СЦШ представляет собой синдром, характеризующийся клинической картиной системного воспаления, с лихорадкой, цитопенией, коагулопатией, полиорганной недостаточностью, гиперферритинемией, и при отсутствии лечения приводит к летальному исходу. Это состояние вызвано аномальной выработкой цитокинов и других воспалительных молекул в результате неконтролируемой активации иммунной системы. Механизмы активации СЦШ могут иметь несколько причин: ревматологическую, онкологическую и инфекционную. Среди них наиболее известной формой СЦШ является сепсис, состояние, вызванное широко распространенной инфекцией, часто связанное с вторичным гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом (ВГЛГ), гипервоспалительным синдромом, характеризующимся гиперцитокинемией и полиорганной недостаточностью. У взрослых ВГЛГ в наибольшей степени провоцируется вирусными инфекциями и встречается в 3,7-4,3% случаев сепсиса. Ключевые признаки ВГЛГ включают постоянную лихорадку (>38,5°C), цитопению и гиперферритинемию; поражение легких (включая острый респираторный дистресс-синдром, ОРДС) встречается примерно у 50% пациентов. Однако последствия сепсиса и СЦШ, как правило, не являются прямым действием патогена (или другого типа исходного вредного стимула), а скорее являются результатом неконтролируемого иммунного ответа на этот патоген. Отличительной чертой СЦШ является неконтролируемый и дисфункциональный иммунный ответ, включающий постоянную активацию и экспансию как лимфоцитов, так и макрофагов, которые секретируют большое количество цитокинов, вызывая цитокиновый шторм. Многие клинические особенности СЦШ можно объяснить действием провоспалительных цитокинов, таких как интерферон (ИНФ), фактор некроза опухоли (ФНО), интерлейкины (ИЛ), такие как ИЛ-1, ИЛ-6 и ИЛ-18. Повышенные уровни этих провоспалительных цитокинов обнаруживаются у большинства пациентов с СЦШ. В этом воспалительном контексте ADAR1 играет ключевую роль посредством модуляции специфических белков, участвующих в активации воспаления и высвобождении провоспалительных цитокинов. Например, при вирусной инфекции, а также при наличии физико-химического стресса (УФ-излучения и окислительного стресса) или других

патогенов активируются белки PKR (протеинкиназа R) и RIG-I (ген I, индуцируемый ретиноевой кислотой). Эти белки в своей активной форме могут индуцировать экспрессию интерферонов типа 1 (ИФН-1) и других провоспалительных цитокинов. Хотя ИФН-1 известен своей противовирусной активностью, избыточная продукция может привести к СЦШ, по этой причине существует несколько ферментов, способных регулировать его экспрессию для поддержания тканевого гомеостаза. Одной из них является ADAR1 (аденозиндеаминаза, действующая на РНК 1), аденозиндезаминаза, специфичная в отношении двухцепочечной РНК, способная связывать и модифицировать вирусные РНК и микроРНК (miRNA) [Song C. et al. Гены 2016]. Во время инфекции ADAR1 связывается с вирусной РНК, предотвращая ее распознавание рецепторами PKR и RIG-I, которые уже не способны активировать гены, ответственные за продукцию ИФН. Более того, ADAR1 благодаря своей аденозиндезаминазной активности может модифицировать нуклеотидную последовательность вирусного генома, тем самым предотвращая его репликацию. Наконец, еще одно противовоспалительное свойство ADAR1 заключается в его способности снижать уровни экспрессии микроРНК, нацеленных на белки с противовоспалительной функцией (такие как, например, miR-101 и miR-30a). Фактически, одним из последствий снижения уровней miR-101 является повышение уровня MKP-1, белка, способного выключать p38 MAPK, тем самым предотвращая выработку медиаторов воспаления, ответственных за СЦШ. Провоспалительное действие p38 MAPK широко задокументировано при ряде патологий из-за неконтролируемого высвобождения цитокинов, в том числе вирусных патологий. Хотя p38 MAPK играет центральную роль в воспалительном ответе, он представляет собой лишь один из многих белков, участвующих в активации каскада провоспалительных цитокинов. Следует отметить, что селективные ингибиторы p38 MAPK не способны активировать ADAR1 и, следовательно, такие ингибиторы лишь частично позволяют противодействовать сложным механизмам, характеризующим СЦШ, особенно при возникновении СЦШ вследствие инфекции.

Кроме того, при вирусной инфекции активность ADAR1 заключается в модификации структуры вирусной РНК путем ингибирования ее синтеза. Наконец, активация ADAR1 позволяет инактивировать клеточные рецепторы, такие как PKR и RIG-I, избегая чрезмерного производства ИНФ, тем самым предотвращая неконтролируемое высвобождение провоспалительных цитокинов.

Хорошо известно, что активация ADAR1 является одним из механизмов врожденного иммунитета, эффективных при нейтрализации РНК-вирусов посредством редактирования их генома [Chung et al., H, Cell 2018].

Несмотря на существование различных препаратов для лечения острых и хронических воспалений, в настоящее время существует неудовлетворенная медицинская потребность в лечении заболеваний, связанных с СЦШ. Лечение этих заболеваний в основном состоит из иммуносупрессии, дополненной контролем основного заболевания, а также использованием антибиотиков или противовирусных препаратов для пациентов с инфекцией [Behrens and Koretzky, arthritis & rheumatology, 2017]. Как и большинство воспалительных заболеваний, СЦШ можно лечить кортикостероидами или, в последнее время, терапией, направленной на блокирование специфических цитокинов (анти-ИЛ-1, анти-ИФН, анти-ИЛ-6). Однако доступные в настоящее время противовоспалительные терапии имеют некоторые ограничения, поскольку они направлены исключительно на контроль определенных цитокинов или из-за резистентности к самой терапии, как в случае кортикостероидов. Тем не менее, современные методы лечения не оказывают трофической поддержки тканям и органам, поврежденным неконтролируемым воспалением, поэтому, даже если само воспаление удается ограничить, системные повреждения часто сохраняются. Эти повреждения поражают, помимо таких важных органов, как легкие (особенно в случае инфекций дыхательных путей), почки, печень и сердце (в последнем может возникнуть сердечная недостаточность из-за массивного апоптоза), а также сосудистый эндотелий, который должен быть надлежащим образом восстановлен. Ни один из современных способов лечения не позволяет ограничить полиорганное повреждение, вызванное СЦШ, поскольку им не хватает трофической и антиапоптотической активности.

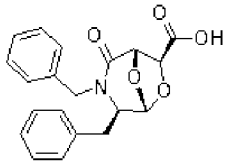
US 2019/0359692 и WO 2019/122909 описывают ингибиторы p38 MAPK для применения при лечении гриппа с тяжелыми осложнениями со стороны дыхательных путей.

Zhou Shangxun et al. (Mediators of Inflammation, 2020; DOI: 10.1155/2020/9607535) демонстрируют, что ADAR1 облегчает воспаление на мышиной модели сепсиса.

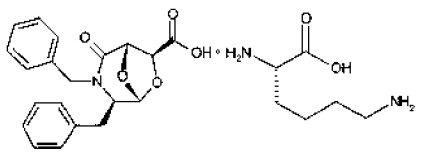
WO 2004000324 от имени того же заявителя описывает производные 3-аза-бицикло[3.2.1]октана в качестве агонистов нейротрофинов человека, которые, таким образом, ценны для применения при лечении заболеваний, при которых нарушены функции нейротрофинов, в частности, функции NGF: нейродегенеративных заболеваний центральной нервной системы, таких как болезнь Альцгеймера (БА), боковой амиотрофический склероз (БАС), болезнь Гентингтона, невропатии, повреждение нервов, вызванное гипоксией, ишемией или травмой, индуцирующей апоптоз нервных клеток; приобретенных иммунодефицитных заболеваний, связанных со сниженной биодоступностью NGF, таких как возрастной иммунодефицит; заболеваний, при которых

целесообразна стимуляция неоангиогенеза, таких как инфаркт миокарда, инсульт или заболевание периферических сосудов; некоторых заболеваний глаз, таких как кератиты различной этиологии, глаукома, дегенеративные или воспалительные состояния сетчатки. WO 2004000324 описывает соединение метил-(1S,4R,5R,7S)-3,4-дибензил-2-оксо-6,8-диокса-3-азабицикло[3.2.1]октан-7-карбоксилат (MT2) в качестве особо предпочтительного соединения.

WO 2013140348, опять же от имени того же заявителя, описывает некоторые карбоновокислые производные 3-азабицикло[3.2.1]октана и их медицинское применение, в частности, при лечении всех патологий, связанных с ишемией-реперфузией, при которых ишемические состояния, вызванные каким-либо снижением или блокировкой кровотока, сопровождаются последующим восстановлением подачи кислорода/питательных веществ к тканям, или для использования в медицинских процедурах, включающих ишемию-реперфузию. WO 2013140348 конкретно описывает (1S,4R,5R,7S)-3,4-дибензил-2-оксо-6,8-диоксан-3-азабицикло[3.2.1]октан-7-карбоновую кислоту (MT6) и ее фармацевтически приемлемые соли и (1S,4R,5R,7S)-3,4-дибензил-2-оксо-6,8-диокса-3-азабицикло[3.2.1]октан-7-карбоновую соль L-лизина (MT8).



MT6



MT8

Заявитель также продемонстрировал с помощью соответствующих доклинических и клинических исследований, что кислота MT6 в форме лизиновой соли (называемой MT8), или натриевой, или калиевой, или любой другой фармацевтически приемлемой соли, растворенной в фосфатном или солевом буфере, или в любом другом фармацевтически приемлемом буфере, в отсутствие или в присутствии консервантов и вспомогательных веществ, может быть использована для лечения заболеваний, при которых нарушены функции нейротрофинов, в частности функции NGF и BDNF.

16 декабря 2014 года MT8 получил статус орфанного препарата от Европейского агентства по лекарственным средствам (EMA) для лечения нейротрофического кератита 8EU/3/14/1400.

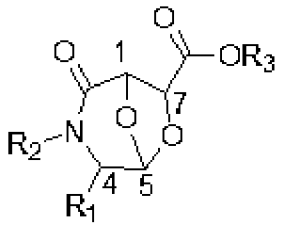
Несмотря на существование многих лекарственных средств, используемых для уменьшения повреждений, возникающих в результате острого и хронического воспаления, все еще существует неудовлетворенная медицинская потребность в лечении этих заболеваний. Следовательно, цель настоящего изобретения состоит в обеспечении соединений, по меньшей мере альтернативных, для применения при лечении острых или

хронических воспалений, при которых возникает так называемый синдром цитокинового шторма (СЦШ).

Таким образом, еще одной целью настоящего изобретения является создание соединений, активирующих ADAR1, для применения при лечении тяжелых воспалительных заболеваний инфекционного или неинфекционного происхождения, характеризующихся цитокиновым штормом и/или неконтролируемым иммунным ответом.

Изложение сущности изобретения

Предметом настоящего изобретения является соединение формулы (I) для применения в качестве активатора аденозиндеаминаз, действующих на РНК 1 (ADAR1), при лечении воспалительных заболеваний, острых или хронических, инфекционных или неинфекционных, характеризующихся цитокиновым штормом и/или неконтролируемым иммунным ответом, где указанное соединение имеет формулу (I):



(I)

где

R_1 выбран из группы, состоящей из арила, C_{1-8} алкиларила;

R_2 выбран из группы, состоящей из C_{1-8} алкиларила;

R_3 выбран из группы H, -C_{1-8} алкила, C_{1-8} алкиларила;

включая фармацевтически приемлемые соли.

В ходе серии экспериментов *in vitro* неожиданно было обнаружено, что соединения, на которые распространяется патент, могут индуцировать:

I) высокую активацию ADAR1 (гомодимеризацию), приводящую к значительному снижению экспрессии miR-101 и, следовательно, к уменьшению высвобождения провоспалительных цитокинов;

II) снижение системной продукции цитокинов, предшествующих ИЛ-6 в функциональном каскаде и, следовательно, снижение эффектов, возникающих в результате «цитокинового шторма» или СЦШ.

Эти эффекты сочетаются с активностью:

III) трофическая поддержка гипоксических тканей на системном уровне за счет уменьшения повреждений, вызванных процессом ишемии/реперфузии;

IV) трофическая поддержка тканей на системном уровне за счет уменьшения повреждений, вызванных воспалительным процессом или СЦШ.

Следовательно, применение фармацевтических препаратов, содержащих соединения формулы (I), являющиеся предметом патента, в качестве активаторов ADAR1 и, следовательно, противовоспалительных и противовирусных средств, полезно для лечения заболеваний, связанных с острым или хроническим воспалением, характеризующихся цитокиновым штормом и/или неконтролируемым иммунным ответом. Кроме того, применение фармацевтических препаратов, содержащих соединения формулы (I), предмет патента, предпочтительно, но не исключительно, полезно для лечения заболеваний дыхательных путей и, в частности, но не исключительно, вызванных вирусными факторами, таких как тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС), вызванный коронавирусом или другими вирусами, для ограничения биохимических и функциональных нарушений в сильно поврежденном эндотелии легких, а также в гипоксических тканях различных органов (головного мозга, почек, печени и др.), часто уже подвергшихся повреждению из-за ранее существовавших или сопутствующих патологий.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении, если не указано иное, термины алкил, арил, алкиларил означают следующее:

- C_{1-8} алкил (Alk_{1-8}) относится к линейным или разветвленным алкильным радикалам, имеющим одинарные связи, C-C. Примеры алкильных групп по настоящему изобретению включают, без ограничения указанными, метил, этил, пропил, изопропил, бутил, пентил, гексил, гептил, октил;

- термин «арил» указывает на группу, содержащую одно или несколько ненасыщенных колец, причем каждое кольцо имеет от 5 до 8 членов, предпочтительно 5 или 6 членов. Примеры арильных групп включают фенил, бифенил и нафтил, но не ограничиваются ими.

Согласно настоящему изобретению арильные группы могут быть заменены одной или несколькими группами, предпочтительно одной или двумя группами, выбранными из группы, состоящей из галогена, циано, нитро, амино, гидрокси, карбоновой кислоты, карбонила и C_{1-6} алкила. (Alk_{1-6}). Термин «галоген» относится к фтору, хлору, брому и йоду.

В соединениях по настоящему изобретению R_1 предпочтительно представляет собой CH_2Ph.

Предпочтительно R_2 представляет собой CH_2Ph.

Предпочтительно R_3 представляет собой H или CH_3.

При необходимости фенильные группы могут быть заменены одной или

несколькими группами и предпочтительно одной или двумя группами, выбранными из группы, состоящей из X, CN, NO_2, NH_2, OH, COOH, (C=O)Alk_{1-6}; где X выбран из группы, состоящей из F, Cl, Br и I.

Среди соединений формулы (I) предпочтительными являются соединения, в которых:

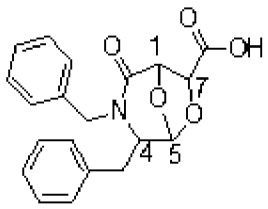
R_1 представляет собой CH_2Ph; и

R_2 представляет собой CH_2Ph; и

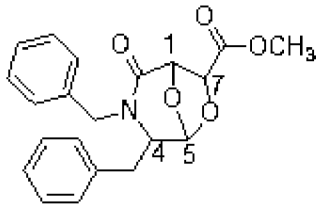
R_3 представляет собой H или CH_3; и

где фенильные группы при необходимости могут быть замещены одной или несколькими группами, предпочтительно одной или двумя группами, выбранными из группы, состоящей из X, CN, NO_2, NH_2, OH, COOH, (C=O)Alk_{1-6}; где X выбран из группы, состоящей из F, Cl, Br и I.

Для целей настоящего изобретения соединения формулы (IA) и (IB) являются более предпочтительными:



(IA)



(IB)

Такие соединения явно могут встречаться в различных стереохимических конфигурациях.

Соединение	**Стереоцентр**			
	1	**4**	**5**	7
1A	R	R	S	S
2A	S	S	R	R
3A	R	R	R	R
4A	S	S	S	S
5A	S	R	R	R
6A	R	S	S	S
7A	R	S	R	R
8A	S	R	S	S
9A	R	R	S	R
10A	S	S	R	S
11A	R	R	R	S
12A	S	S	S	R
13A	R	S	R	S
14A	S	R	S	R
15A	R	S	S	R
16A (MT6)	S	R	R	S

Соединение	**Стереоцентр**

	1	**4**	**5**	7
1B	R	R	S	S
2B	S	S	R	R
3B	R	R	R	R
4B	S	S	S	S
5B	S	R	R	R
6B	R	S	S	S
7B	R	S	R	R
8B	S	R	S	S
9B	R	R	S	R
10B	S	S	R	S
11B	R	R	R	S
12B	S	S	S	R
13B	R	S	R	S
14B	S	R	S	R
15B	R	S	S	R
16B (MT2)	S	R	R	S

Для целей настоящего изобретения соединения метил-(1S,4R,5R,7S)-3,4-дибензил-2-оксо-6,8-диокса-3-азабицикло[3.2.1]октан-7-карбоксилат (MT2), (1S,4R,5R,7S)-3,4-дибензил-2-оксо-6,8-диокса-3-азабицикло[3.2.1]октан-7-карбоновая кислота, названная (MT6) и ее фармацевтически приемлемые соли, среди солей MT6 особый интерес представляют следующие соли: соли калия, соли натрия, соли лизина, органические и неорганические соли четвертичного аммония. Таким образом, особо предпочтительным соединением является (1S,4R,5R,7S)-3,4-дибензил-2-оксо-6,8-диокса-3-азабицикло[3.2.1]октан-7-карбоновой кислоты L-лизиновая соль (MT8).

Было обнаружено, что соединения формулы (I), описанные выше, способны уменьшать количество воспалительных цитокинов, продуцируемых ЛПС-активированными моноцитами/макрофагами человека и ЛПС-активированными дендритными клетками человека (см. Фиг.1).

В частности, при провоспалительных состояниях соединение по изобретению способно активировать ADAR1, фермент, который благодаря своей РНК-редактирующей активности способен снижать экспрессию miR-101, микроРНК (miRNA), участвующей в провоспалительном ответе. Активацию ADAR1 соединением по изобретению наблюдали в клеточных линиях HEK-293 TrkA (см. Фиг.2). Фактически было показано, что введение соединения вызывает заметное увеличение гомодимерной формы ADAR1/ADAR1 по сравнению с необработанными клетками, способствуя образованию активной формы белка и, таким образом, благоприятствуя процессу редактирования. Способность ADAR1 снижать экспрессию miR-101 наблюдали в клетках, обработанных соединением по изобретению, в присутствии или в отсутствие нокдауна ADAR1 (Фиг.3 и Фиг.4).

Более высокая активность ADAR1 на уровне каждой отдельной клетки может

оказаться полезной для защиты клеток от повреждений, вызванных любой вирусной инфекцией и воспалительными процессами, не обязательно инфекционного характера.

Активность ADAR1 является фактически двойной:

- при неинфекционном воспалительном процессе ADAR1 может связывать и редактировать микроРНК, которые после модификации не могут распознавать свои последовательности-мишени и поэтому деградируют; в частности, это происходит для miR-101, а также для miR-30a, микроРНК, экспрессия которой определяет увеличение провоспалительных цитокинов, таких как ФНО-α и ИЛ-6;

- кроме того, при вирусной инфекции активность ADAR1 заключается в структурной модификации вирусной РНК путем ингибирования ее синтеза.

Наконец, активация ADAR1 позволяет дезактивировать клеточные сенсоры, такие как PKR и RIG-I, избегая чрезмерной продукции ИНФ, тем самым предотвращая неконтролируемое высвобождение провоспалительных цитокинов.

В заключение, соединение по изобретению обладает мощной противовоспалительной и противовирусной активностью, поскольку оно может определять:

i) снижение вирусной нагрузки и последующее инфицирование за счет увеличения цитоплазматических уровней ADAR1, фермента, способного повреждать геном РНК-вирусов;

ii) снижение системной продукции цитокинов и последующее уменьшение эффектов, происходящих от так называемого «цитокинового шторма» у пациента, за счет активации ADAR1 и последующего снижения miR-101;

iii) уменьшение повреждений, вызванных процессом ишемии/реперфузии, возникающим при тяжелых воспалительных состояниях, за счет метаболической поддержки гипоксических тканей.

Таким образом, соединения для применения по настоящему изобретению в качестве активаторов ADAR1 являются эффективными противовоспалительными и противовирусными агентами и поэтому могут быть использованы для лечения заболеваний, связанных с острым или хроническим воспалением, характеризующихся цитокиновым штормом и/или неконтролируемым иммунным ответом.

В частности, соединения для применения по настоящему изобретению в качестве активаторов ADAR1 потенциально полезны для лечения инфекционных заболеваний вирусного происхождения, таких как:

- вирус герпеса,

- вирус Эпштейна-Барр,

- цитомегаловирус,

- аденовирус,

- ВПЧ,

- коронавирус,

- энтеровирус,

- ротавирус,

- парвовирус,

- вирус гриппа А,

- вирус Эбола,

- представители рода вируса Марбург,

- представители вида вируса Денге,

- инфекции гепатита А (ВГА), В (ВГВ), С (ВГС),

- панэнцефалит (ПСПЭ) при коревых вирусных инфекциях,

- вирус геморрагической лихорадки (*Arenaviridae, Bunyaviridae, Filoviridae, Falviviridae* и *Togaviridae*),

- вирус кори,

- вирус эпидемического паротита,

- вирус краснухи,

- парэховирус,

- Т-лимфотропный вирус человека.

Соединения для применения по настоящему изобретению в качестве активаторов ADAR1 и, следовательно, противовоспалительных средств также потенциально полезны для лечения инфекционных заболеваний, характеризующихся цитокиновым штормом,

i) бактериального происхождения, таких как:

- Aeromonas hydrophila,

- Brucella sp.,

- Chlamydia sp.,

- Clostridium sp.,

- Escherichia coli,

- Legionella sp.,

- Mycobacteria,

- Salmonella,

- Staphylococcus aureus,

- Acinetobacter baumannii,

- Mycobacterium tuberculosis,

- Mycoplasma pneumonia;

ii) паразитарного или грибкового происхождения, таких как:

- Plasmodium sp.,
- Leishmania sp.,
- Toxoplasma gondii,
- Entamoeba histolytica,
- Babesia sp.,
- Ascaris lumbricoides,
- Helminths,
- Candida albicans,
- Histoplasma,
- Cryptococcus neoformans,
- Pneumocystis sp.,
- Penicillium marneffei;

iii) зоонозного происхождения, таких как:

- Brucella,
- Rickettsiae,
- Ehrlichia,
- Coxiella burnetiid,
- Mycobacterium avium,
- Clostridium,
- Leptospira.

Соединения для применения по настоящему изобретению в качестве активаторов ADAR1, вызывающих снижение состояния острого и хронического воспаления, также потенциально полезны для лечения заболеваний неинфекционного происхождения, таких как:

- сепсис,
- гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз,
- болезнь Стилла у взрослых (БСВ),
- хроническое воспаление печени,
- ожирение,
- атеросклероз,
- пародонтит,
- цирроз.

Таким образом, соединения для применения согласно настоящему изобретению в

качестве активаторов ADAR1 и, следовательно, противовоспалительных средств, также потенциально полезны для лечения аутоиммунных и дегенеративных заболеваний, таких как:

- гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз,
- лимфопролиферативные синдромы,
- первичные и приобретенные иммунодефициты, не связанные с дефицитом NGF,
- наследственный симметричный дисхроматоз (DSH),
- синдром Айкарди-Гутьерес (AGS),
- редкие генетические заболевания, связанные с ИЛ-1/инфламмасомными нарушениями,
- ИФН-опосредованные расстройства,
- заболевания, опосредованные NF-κB/убиквитинином,
- синдром Макла-Уэллса,
- синдром гипер-IgD,
- педиатрический гранулематозный артрит,
- дефицит ADA2,
- сепсис,
- артрит/остеоартрит,
- ювенильный идиопатический артрит,
- красная волчанка,
- болезнь Кавасаки.

Соединения для применения согласно настоящему изобретению в качестве активаторов ADAR1 и, следовательно, противовоспалительных и противовирусных средств, особенно полезны также для лечения воспалительных заболеваний дыхательных путей, таких как:

- тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС), вызванный коронавирусом или другими вирусами,
- астма,
- хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ),
- бронхоэктазия,
- интерстициальная болезнь легких или заболевание легких,
- бронхиолит,
- бронхолегочная дисплазия (БЛД) у недоношенных детей,
- туберкулез,
- коклюш,

- острые ингаляционные поражения вследствие воздействия вредных и токсических веществ,

- профессиональные инфекции дыхательных путей, такие как

• легионеллез,

• Ку-лихорадка,

- легочные интерстициальные заболевания, вызванные профессиональной деятельностью, такие как

• пневмокониоз,

• заболевания легких от воздействия металлов,

• экзогенный аллергический альвеолит,

• синдром Ардистил;

- редкие заболевания легких, такие как:

• легочный васкулит,

• идиопатическая эозинофильная пневмония,

• легочный альвеолярный протеиноз,

• лимфангиолейомиоматоз (LAM),

• легочный гистиоцитоз из клеток Лангерганса,

• Синдром Бёрта-Хога-Дьюба.

Соединения для применения согласно настоящему изобретению могут быть включены в состав обычных фармацевтических композиций, которые могут содержать один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей и/или разбавителей.

Введение этих композиций можно осуществлять любым общепринятым способом введения, например, парентерально в виде растворов или суспензий для инъекций, перорально, местно, назально, подкожно, субконъюнктивально и т.д.

Вышеуказанные композиции могут быть в виде таблеток, капсул, растворов, дисперсий, суспензий, липосомальных составов, микросфер, наносфер, пен, кремов и мазей, эмульсий, микроэмульсий и наноэмульсий, а также аэрозолей, а также могут быть приготовлены таким образом, чтобы обеспечить контролируемое или замедленное высвобождение активного ингредиента.

Все вышеописанные фармацевтические композиции могут содержать по меньшей мере одно из настоящих соединений формулы (I) в качестве активного ингредиента, при необходимости в комбинации с другими активными ингредиентами или адъювантами, выбранными в соответствии с подлежащими лечению патологическими состояниями.

Настоящее изобретение можно лучше понять в свете следующих примеров осуществления.

Краткое описание чертежей

Фигура 1 - Графики показывают продукцию ИЛ-1β, ФНО-α и ИЛ-6 в человеческих моноцитах и дендритных клетках, стимулированных ЛПС, в присутствии или в отсутствие соединения MT8. Очевидно, что уровни продукции провоспалительных цитокинов значительно ниже как в моноцитах, так и в дендритных клетках, обработанных соединением MT8, по сравнению с необработанными клетками.

Фигура 2 - Влияние MT8 на активацию гомодимерного комплекса (активной формы белка) ADAR1. Гель показывает индукцию гомодимерного комплекса ADAR1/ADAR1 в клетках HEK-293 TrkA, обработанных соединением MT8. На графике показано количественное определение полос геля, выполненное с помощью денситометрии, и оно выражено как отношение между плотностью полос гомодимерного комплекса ADAR1/ADAR1 и мономера ADAR1. Уровни гомодимера ADAR1/ADAR1, индуцированного соединением MT8, значительно выше, чем в контроле.

Фигура 3 - Влияние MT8 на снижение miR-101 на модели воспаления *in vitro*. На графике показана способность MT8 снижать экспрессию внутриклеточной miR-101. Это событие наблюдали на моноцитах и дендритных клетках человека, культивированных в присутствии ЛПС, одного из соединений с самой высокой провоспалительной активностью. Уровень miR-101 количественно определяли с помощью ПЦР в реальном времени с использованием 5s рибосомной РНК для нормализации сигнала, а относительное увеличение рассчитывали с использованием метода $2^{-\Delta Ct}$.

Фигура 4 - Влияние MT8 на уровни экспрессии miR-101 после нокдауна ADAR1. На графике показана способность соединения MT8 снижать экспрессию miR-101 в клетках HEK-293 TrkA, трансфицированных подвергнутой перестановке (контрольной) миРНК, но не в клетках, трансфицированных миРНК, специфичной для ADAR1. Уровень miR-101 количественно определяли с помощью ПЦР в реальном времени с использованием 5s рибосомной РНК для нормализации сигнала, а относительное увеличение рассчитывали с использованием метода 2-ΔCt.

Экспериментальная часть

Материалы

(1S,4R,5R,7S)-3,4-дибензил-2-оксо-6,8-диокса-3-азабицикло[3.2.1]октан-7-карбоновой кислоты L-лизиновую соль (MT8) получали, как описан в WO 2013140348.

ЭКСПЕРИМЕНТ 1. Влияние MT8 на продукцию ИЛ-1β, ФНО-α и ИЛ-6 в моноцитах и дендритных клетках человека, стимулированных ЛПС.

Липополисахарид (ЛПС) представляет собой эндотоксин, вызывающий сильную иммунную реакцию. В присутствии ЛПС клетки иммунной системы, такие как моноциты

и дендритные клетки, реагируют, продуцируя большое количество воспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1β, ФНОα и ИЛ-6. Чтобы проверить способность MT8 модулировать выработку этих цитокинов, моноциты человека (выделенные из лейкоцитарной пленки с использованием анти-CD14-антитела) и дендритные клетки, происходящие из моноцитов человека (MDC), культивировали в концентрации 10^6 клеток/мл в полной среде и стимулировали с помощью 50 нг/мл ЛПС, в присутствии или в отсутствие MT8 в концентрации 10 или 30 мкМ. После 18 часов инкубации собирали надосадочную жидкость обоих типов клеток и оценивали продукцию ИЛ-1β, ФНО-α и ИЛ-6 с помощью технологии мультиплексного анализа Luminex. Полученные результаты (Фиг.1) показали, что в описанных выше экспериментальных условиях ЛПС, как и ожидалось, был способен индуцировать продукцию ИЛ-1β, ФНО-α и ИЛ-6, и что такая продукция снижается при обработке MT8. В частности, MT8 был способен дозозависимым образом снижать количество ИЛ-1β как в моноцитах, так и в дендритных клетках. В последних зарегистрированное снижение составило более 50% (Фиг.1B), в то время как в моноцитах снижение составило около 17% (Фиг.1A). В любом случае это снижение является статистически значимым. Аналогичные результаты были получены в отношении продукции ФНО-α, которая в присутствии MT8 снижается примерно на 17% в моноцитах (Фиг.1C) и на 19% в дендритных клетках (Фиг.1D). Опять же, снижение, наблюдаемое в присутствии MT8, является статистически значимым. Наконец, продукция ИЛ-6 также значительно снижается в присутствии MT8, примерно на 70% в моноцитах (Фиг.1E) и примерно на 65% в дендритных клетках (Фиг.1F). Кроме того, в последнем случае снижение является статистически значимым.

Таким образом, эксперименты показывают, что во всех случаях уровни продукции трех цитокинов значительно ниже как в моноцитах, так и в дендритных клетках, обработанных соединением MT8, по сравнению с необработанными клетками.

ЭКСПЕРИМЕНТ 2. Влияние MT8 на активацию гомодимерного комплекса ADAR1.

Для изучения действия соединения MT8 на фермент ADAR1 клетки HEK-293 TrkA культивировали в бессывороточной среде в течение 18 часов и инкубировали с 10 мкМ MT8 или без него в течение еще 60 минут. Затем клетки лизировали в буфере RIPA (50 мМ Трис-HCl, pH 7,4; 150 мМ NaCl; 2 мМ ЭДТА; 1 мМ NaF; 1 мМ ортованадата натрия, 1% NP-40). подвергали биохимическому анализу методом вестерн-блоттинга. Вкратце, 500 мкг общего белка подвергали иммунопреципитации с использованием специфического антитела против ADAR1. Иммунопреципитированный продукт наносили на полиакриламидный гель и переносили на мембрану из ПВДФ. Затем мембрану

инкубировали со специфическими антителами против ADAR1 для обнаружения сигнала. Анализ позволил выделить наличие гомодимерных комплексов ADAR1/ADAR1 и мономерных форм ADAR1 p150 и p110. Количественное определение гомодимерного комплекса ADAR1, выполненное денситометрическим методом, выражали как отношение плотности полосы гомодимера ADAR1/ADAR1 к плотности полосы мономера ADAR1 p110. Полученные данные показали (Фиг.2), что введение соединения MT8 вызывает сильное увеличение гомодимерной (активной) формы ADAR1 по сравнению с необработанными клетками, что способствует процессу редактирования.

ЭКСПЕРИМЕНТ 3. Влияние MT8 на экспрессию miR-101 на модели воспаления *in vitro*.

Продукция ИЛ-1β и ФНОα и ИЛ-6, запускаемая провоспалительными стимулами, такими как ЛПС, определяется активацией специфических путей, среди которых задействована экспрессия miR-101.

Чтобы изучить влияние MT8 на активность miR-101 в условиях провоспалительного процесса, человеческие моноциты, выделенные из лейкоцитарной пленки, стимулировали 1 мкг/мл ЛПС в присутствии или в отсутствие MT8 в конечной концентрации 10 мкМ. Через 60 минут клетки лизировали в TRIzol для выделения общей РНК, которую затем использовали для количественного определения miR-101 с помощью ПЦР в реальном времени. Результаты, полученные с помощью ПЦР в реальном времени, показали, что применение соединения MT8 вызывало сильное снижение уровня экспрессии miR-101 по сравнению с моноцитами, обработанными одним ЛПС. Количественное определение проводили с использованием гена рибосомной РНК 5s в качестве гена домашнего хозяйства, а относительное увеличение рассчитывали с использованием метода $2^{-\Delta Ct}$.

На графике показана способность соединения MT8 снижать экспрессию miR-101 внутри клетки. Это событие наблюдали на моноцитах человека, культивируемых в присутствии ЛПС, одного из соединений с наибольшей провоспалительной активностью.

Поэтому было неожиданно обнаружено, что в клеточных и тканевых системах воздействие MT8, одного из соединений, являющихся объектом патента, определяет в течение 1 часа снижение miR-101, это объясняет быстрое снижение провоспалительных цитокинов сразу после обработки MT8. Таким образом, полученные данные (Фиг.3) показывают, что при провоспалительных расстройствах соединение MT8 за счет снижения экспрессии miR-101 способно определять уменьшение состояния клеточного воспаления.

ЭКСПЕРИМЕНТ 4. Влияние MT8 на уровни экспрессии miR-101 после нокдауна

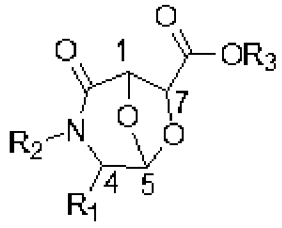
ADAR1.

Для изучения влияния MT8 на механизмы регуляции miR-101 в условиях метаболического стресса клетки HEK-293 TrkA трансфицировали ADAR1-специфичной миРНК или контрольной миРНК (подвергнутой перестановке) в конечной концентрации 50 нМ. Через 48 часов клетки инкубировали в бессывороточной среде в течение 18 часов и стимулировали MT8 в концентрации 10 мкМ еще в течение 60 минут. Клетки лизировали с помощью TRIzol для выделения общей РНК, используемой для анализа miR-101 с помощью ПЦР в реальном времени. Количественное определение miR-101 проводили с использованием гена рибосомной РНК 5s в качестве гена домашнего хозяйства, а относительное увеличение рассчитывали с использованием метода $2^{-\Delta Ct}$. Полученные результаты показали, что применение соединения MT8 вызывало заметное снижение уровня экспрессии miR-101 в клетках, трансфицированных подвергнутой перестановке миРНК, по сравнению с клетками, трансфицированными миРНК, специфичной для ADAR1, указывая на то, что снижение уровней miR-101 регулируется активностью ADAR1.

В совокупности эти данные показывают (Фиг.4), что в экспериментальных условиях, описанных выше, лечение MT8 способно снижать уровни miR-101 за счет активации ADAR1, что позволяет блокировать продукцию провоспалительных цитокинов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I) для применения в качестве активатора аденозиндезаминазы, действующей на РНК 1 (ADAR1), при лечении воспалительных заболеваний, характеризующихся цитокиновым штормом и/или неконтролируемым иммунным ответом, имеющее формулу (I)



(I)

где

R_1 выбран из группы, состоящей из арила, C_{1-8} алкиларила;

R_2 выбран из группы, состоящей из C_{1-8} алкиларила;

R_3 выбран из группы H, -C_{1-8} алкила, C_{1-8} алкиларила;

включая фармацевтически приемлемые соли.

2. Соединение для применения по п.1, где

R_1 представляет собой CH_2Ph; или

R_2 представляет собой CH_2Ph; или

R_3 представляет собой H или CH_3; и

при необходимости фенильные группы могут быть замещены одной или несколькими группами и предпочтительно одной или двумя группами, выбранными из группы, состоящей из X, CN, NO_2, NH_2, OH, COOH, (C=O)Alk_{1-6}; где X выбран из группы, состоящей из F, Cl, Br и I.

3. Соединение для применения по любому из предыдущих пунктов, где

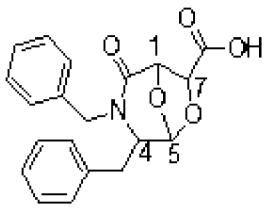
R_1 представляет собой CH_2Ph; и

R_2 представляет собой CH_2Ph; и

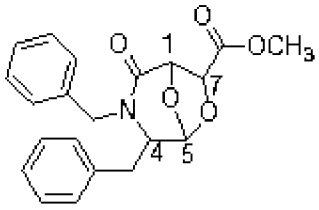
R_3 представляет собой H или CH_3; и

где фенильные группы при необходимости могут быть замещены одной или несколькими группами, предпочтительно одной или двумя группами, выбранными из группы, состоящей из X, CN, NO_2, NH_2, OH, COOH, (C=O)Alk_{1-6}; где X выбран из группы, состоящей из F, Cl, Br и I.

4. Соединение для применения по любому из предыдущих пунктов, имеющее формулу (IA) или (IB)



(IA)



(IB).

5. Соединение для применения по п.4, выбранное из группы, состоящей из (1S,4R, 5R,7S)-3,4-дибензил-2-оксо-6,8-диокса-3-азабицикло[3.2.1]метилоктан-7-карбоксилата (МТ2), (1S,4R,5R,7S)-3,4-дибензил-2-оксо-6,8-диокса-3-азабицикло[3.2.1]октан-7-карбоновой кислоты (МТ6) и ее фармацевтически приемлемых солей.

6. Соединение для применения по п.5, которое представляет собой (1S,4R,5R,7S)-3,4-дибензил-2-оксо-6,8-диокса-3-азабицикло[3.2.1]октан-7-карбоновой кислоты L-лизиновую соль.

7. Соединение для применения по любому из пп.1-6, где указанные острые или хронические воспалительные патологии возникают в результате инфекции.

8. Соединение по п.7, где указанные острые или хронические воспалительные патологии возникают в результате инфекции, индуцированной вирусными факторами.

9. Соединение для применения по п.8, где указанные острые или хронические воспалительные патологии, возникающие в результате инфекции, индуцированной вирусными факторами, выбраны из группы, состоящей из:

- вируса герпеса,
- вирус Эпштейна-Барр,
- цитомегаловируса,
- аденовируса,
- ВПЧ,
- коронавируса,
- энтеровируса,
- ротавируса,
- парвовируса,
- вируса гриппа А,
- вируса Эбола,
- представителей рода вируса Марбург,
- представителей видов вируса Денге,
- вирусных инфекций гепатита А (HAV), В (HBV), С (HCV),
- панэнцефалита (ПСПЭ) при вирусе кори,
- вируса геморрагической лихорадки (*Arenaviridae, Bunyaviridae, Filoviridae,*

Falviviridae и *Togaviridae*),

- вируса кори,

- вируса эпидемического паротита,

- вируса краснухи,

- парэховируса,

- Т-лимфотропного вируса человека, и

- вирусов гриппа и парагриппа.

10. Соединение для применения по п.7, где воспалительные патологии являются тяжелыми патологиями:

i) бактериального происхождения, выбранными из группы, состоящей из

- Aeromonas hydrophila,

- Brucella sp.,

- Chlamydia sp,

- Clostridium sp.,

- Escherichia coli,

- Legionella sp.,

- Mycobacteria, Mycobacterium tuberculosis,

- Salmonella,

- Staphylococcus aureus, и

- Acinetobacter baumannii;

ii) паразитарного и грибкового происхождения, выбранными из группы, состоящей из:

- Plasmodium sp.,

- Leishmania sp.,

- Toxoplasma gondii,

- Entamoeba histolytica,

- Babesia sp.,

- Ascaris lumbricoides,

- Helminths,

- Candida albicans,

- Histoplasma,

- Cryptococcus neoformans,

- Pneumocystis sp., и

- Penicillium marneffei;

iii) зоонозного происхождения, выбранными из группы, состоящей из:

- Brucella,

- Rickettsiae,

- Ehrlichia,

- Coxiella burnetiid,

- Mycobacterium avium,

- Clostridium, и

- Leptospira.

11. Соединение для применения по любому из пп.1-6, где воспалительные патологии являются тяжелыми и имеющими аутоиммунное и/или дегенеративное происхождение, выбранными из группы, состоящей из:

- гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза,

- лимфопролиферативных синдромов,

- первичных и приобретенных иммунодефицитов, не связанных с дефицитом NGF,

- наследственного симметричного дисхроматоза (DSH),

- редких генетических заболеваний, связанных с ИЛ-1/инфламмасомными нарушениями,

- ИФН-опосредованных нарушений,

- нарушений, опосредованных NF-κB/убиквитинином,

- синдрома Макла-Уэллса,

- синдрома гипер-IgD,

- педиатрического гранулематозного артрита,

- дефицита ADA2,

- сепсиса,

- артрита/остеоартрита,

- ювенильного идиопатического артрита,

- красной волчанки,

- болезни Кавасаки.

12. Соединение для применения по любому из пп.1-6, где воспалительные заболевания представляют собой тяжелые воспалительные заболевания дыхательных путей, выбранные из группы, состоящей из:

- тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС), вызванного коронавирусом или другими вирусами,

- астмы,

- хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ),

- бронхоэктазии,

- интерстициальной болезни легких или заболевания легких,

- бронхиолита,

- бронхолегочной дисплазии (БЛД) недоношенных детей,

- туберкулеза,

- коклюша,

- острых ингаляционных поражений вследствие воздействия вредных и токсических веществ,

- профессиональных инфекций дыхательных путей, выбранных из группы, состоящей из

• легионеллеза,

• Ку-лихорадки;

- интерстициальных заболеваний легких, вызванных профессиональной деятельностью, выбранных из группы, состоящей из:

• пневмокониоза,

• заболеваний легких от воздействия металлов,

• экзогенного аллергического альвеолита,

• синдрома Ардистил;

- редких заболеваний легких, выбранных из группы, состоящей из:

• легочного васкулита,

• идиопатической эозинофильной пневмонии,

• легочного альвеолярного протеиноза,

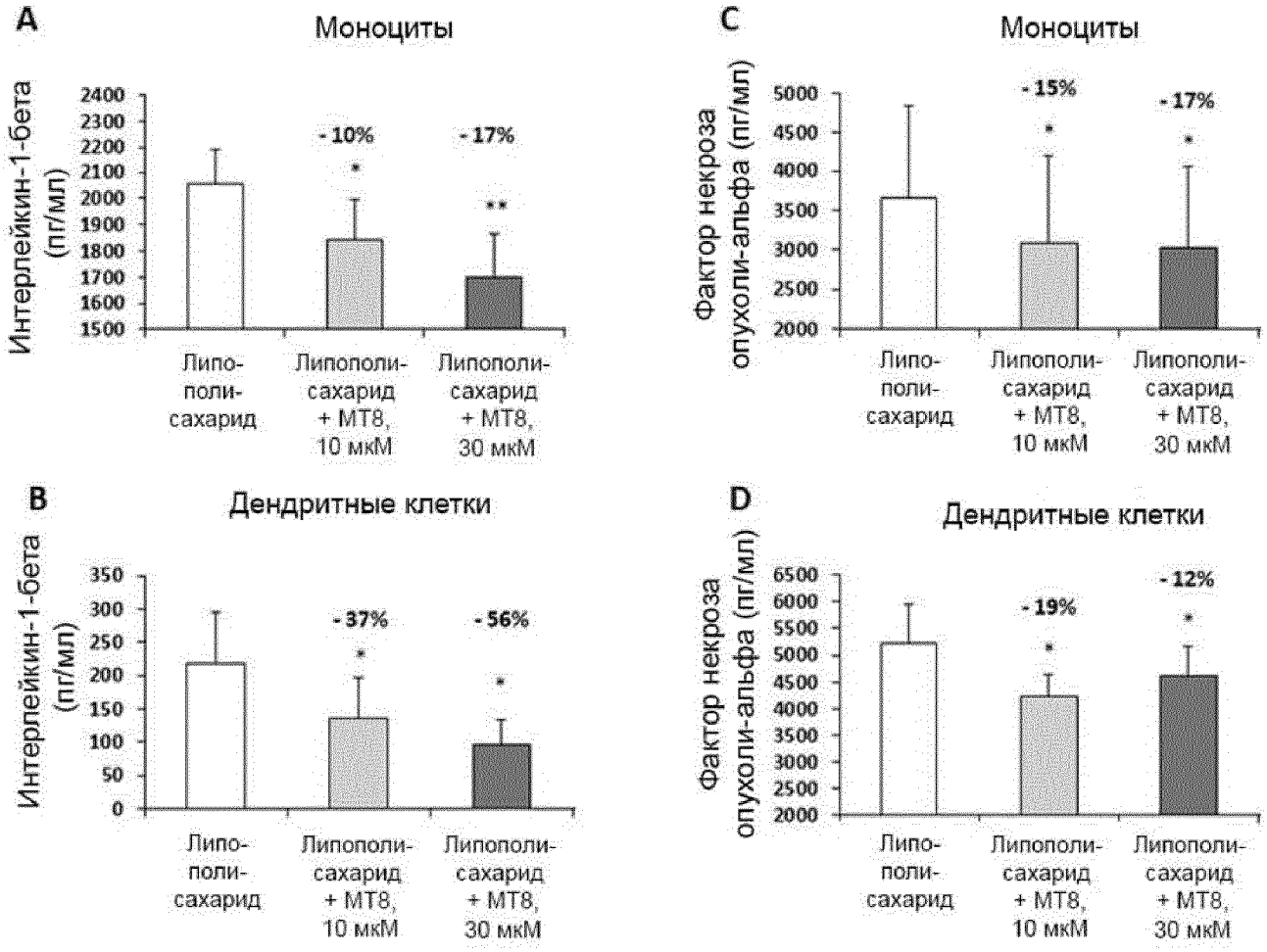
• лимфангиолейомиоматоза (LAM),

• легочного гистиоцитоза из клеток Лангерганса,

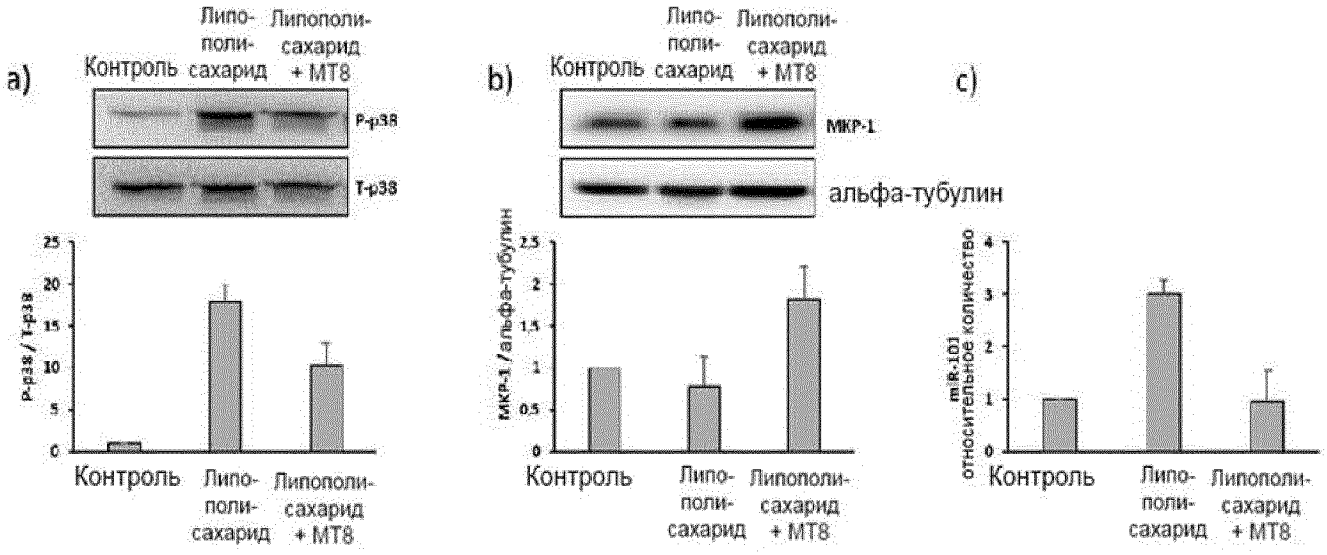
• синдрома Бёрта-Хога-Дьюба.

- гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза.

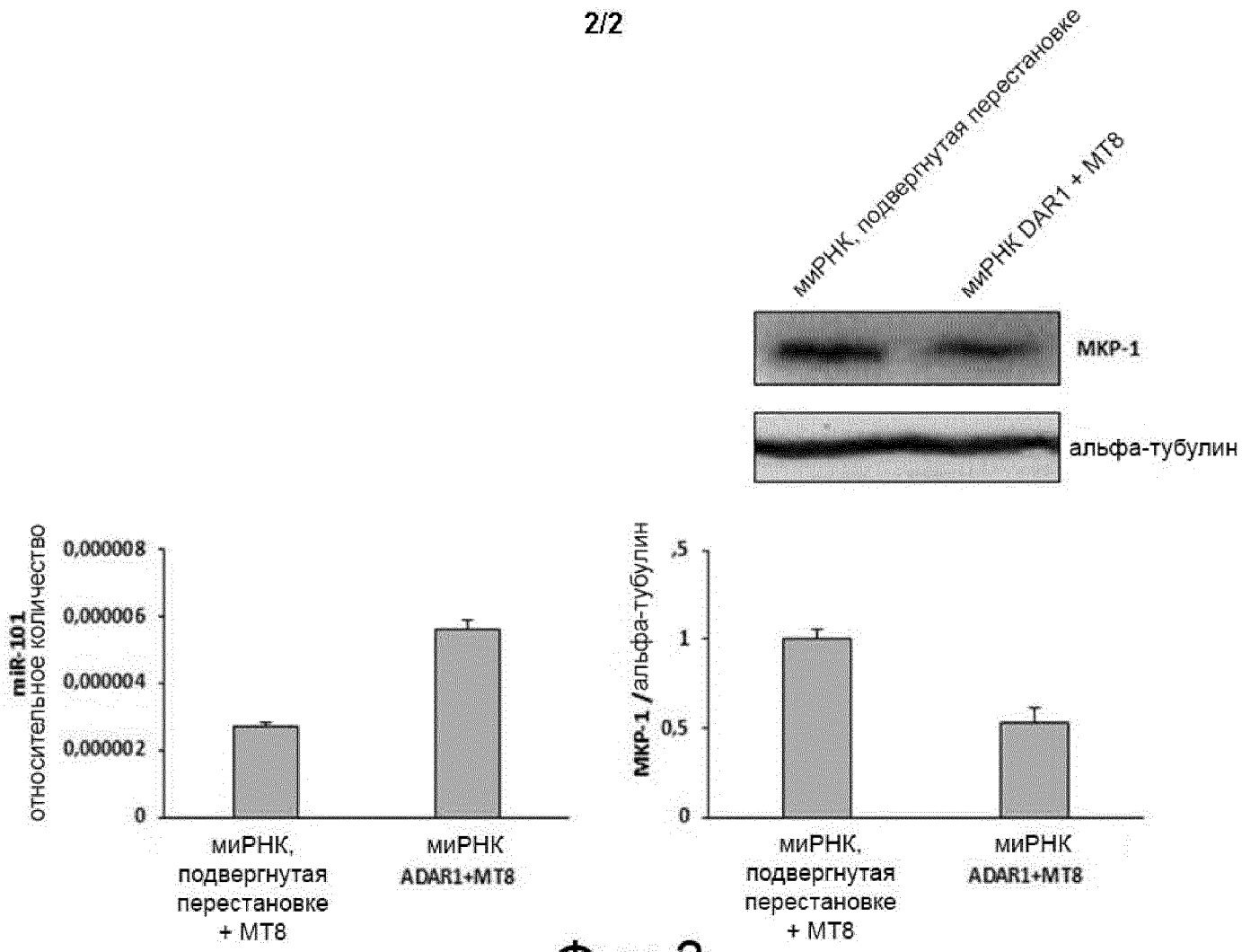
13. Соединение для применения по любому из предыдущих пунктов в комбинации по меньшей мере с одним другим активным ингредиентом или адъювантом, выбранным в соответствии с подлежащим лечению патологическим состоянием.


A
Моноциты
Интерлейкин-1-бета (пг/мл)
2400
2300
2200
2100
2000
1900
1800
1700
1600
1500
- 10%
- 17%
*
**
Липо-поли-сахарид
Липополи-сахарид + MT8, 10 мкМ
Липополи-сахарид + MT8, 30 мкМ
C
Моноциты
Фактор некроза опухоли-альфа (пг/мл)
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
- 15%
- 17%
*
Липо-поли-сахарид
Липополи-сахарид + MT8, 10 мкМ
Липополи-сахарид + MT8, 30 мкМ
B
Дендритные клетки
Интерлейкин-1-бета (пг/мл)
350
300
250
200
150
100
50
0
- 37%
- 56%
*
Липо-поли-сахарид
Липополи-сахарид + MT8, 10 мкМ
Липополи-сахарид + MT8, 30 мкМ
D
Дендритные клетки
Фактор некроза опухоли-альфа (пг/мл)
6500
6000
5500
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
- 19%
- 12%
*
Липо-поли-сахарид
Липополи-сахарид + MT8, 10 мкМ
Липополи-сахарид + MT8, 30 мкМ

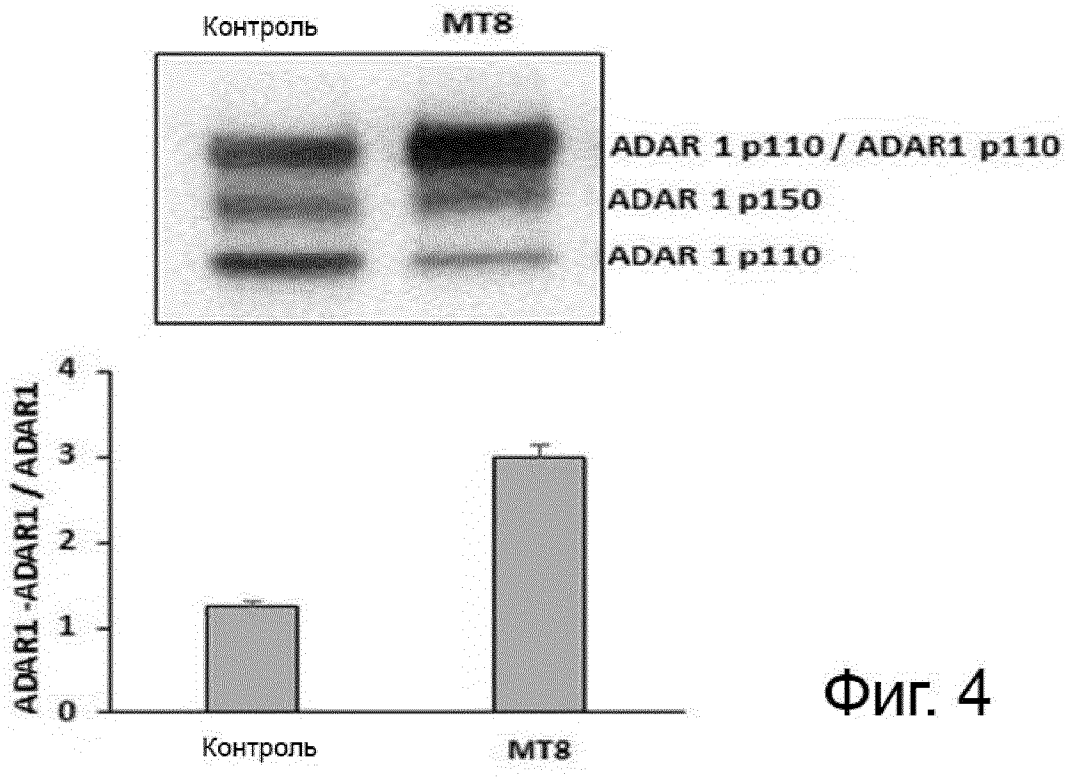
Фиг. 1


a)
Контроль
Липо-поли-сахарид
Липополи-сахарид + MT8
P-p38
T-p38
P-p38 / T-p38
25
20
15
10
5
0
Контроль
Липо-поли-сахарид
Липополи-сахарид + MT8
b)
Контроль
Липо-поли-сахарид
Липополи-сахарид + MT8
MKP-1
альфа-тубулин
MKP-1 / альфа-тубулин
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Контроль
Липо-поли-сахарид
Липополи-сахарид + MT8
c)
miR-101 относительное количество
4
3
2
1
0
Контроль
Липо-поли-сахарид
Липополи-сахарид + MT8

Фиг. 2


миРНК, подвергнутая перестановке
миРНК DAR1 + MT8
МКР-1
альфа-тубулин
miR-101
относительное количество
0,000008
0,000006
0,000004
0,000002
0
миРНК, подвергнутая перестановке + MT8
миРНК ADAR1+MT8
МКР-1 /альфа-тубулин
,5
1
0,5
0
миРНК, подвергнутая перестановке + MT8
миРНК ADAR1+MT8

Фиг. 3


Контроль
MT8
ADAR 1 p110 / ADAR1 p110
ADAR 1 p150
ADAR 1 p110
ADAR1 -ADAR1 / ADAR1
4
3
2
1
0
Контроль
MT8

Фиг. 4