

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390843 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.22

(22) Дата подачи заявки
2021.09.08

(51) Int. Cl. C07D 405/12 (2006.01)
C07D 403/12 (2006.01)
C07D 413/12 (2006.01)
C07D 215/16 (2006.01)
C07D 401/12 (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНЫХ ДИСТРОФИЙ

(31) 63/077,329; 63/148,823

(32) 2020.09.11; 2021.02.12

(33) US

(86) PCT/US2021/049362

(87) WO 2022/055926 2022.03.17

(71) Заявитель:

ДЗЕ РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ
(US)

(72) Изобретатель:

Кросби Рашель Х., Шу Синтия,
Джон Варгиз, Кампанья Хесус,
Ягодзинска Барбара, Парфенова
Любовь, Мохонова Екатерина (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к соединениям, которые увеличивают экспрессию саркоспана. Изобретение также относится к способам лечения заболевания, связанного со снижением или дисфункцией комплекса, связанного с дистрофином, у субъекта, нуждающегося в этом.

A1

202390843

202390843

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577572EA/085

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНЫХ ДИСТРОФИЙ

Родственные заявки

В настоящей заявке испрашивается преимущество предварительной заявки США № 63/077329, поданной 11 сентября 2020 г., и предварительной заявки США № 63/148823, поданной 12 февраля 2021 г., содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Государственная поддержка

Это изобретение было сделано при государственной поддержке в соответствии с номерами грантов HL126204, AR048179 и AR065972, присужденными Национальным институтом здравоохранения. Правительство имеет определенные права на настоящее изобретение.

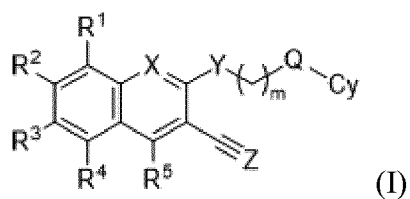
Уровень техники

Мышечные дистрофии охватывают около тридцати наследственных заболеваний, характеризующихся слабостью и истощением мышечной ткани, с разрушением нервной ткани или без него. Существует девять основных типов мышечной дистрофии, каждый из которых включает возможную потерю силы, увеличение инвалидности и возможную физическую деформацию. Мышечная дистрофия Дюшенна (DMD) является наиболее известным типом мышечной дистрофии, поражающим примерно 1 из каждых 5700 рожденных младенцев мужского пола во всем мире. DMD вызывается потерей адгезии сарколеммы к внеклеточному матриксу.

Разработка методов лечения DMD набирает обороты благодаря недавнему ускоренному утверждению этеплирсена в 2016 году и увеличению финансирования программ по редким заболеваниям частным сектором. Однако существующих одобренных FDA препаратов для лечения DMD недостаточно для существенного замедления прогрессирования заболевания. Хотя кортикостероиды ослабляют воспаление и продлевают ходьбу на несколько лет, они не устраняют нарушения адгезионного комплекса и нестабильности мембран. Терапия с пропуском экзона антисмысловыми олигонуклеотидами этеплирсен увеличивает выработку укороченного белка дистрофина, но применима только примерно к 14% пациентов с DMD с мутациями, поддающимися пропуску экзона 51. Остается потребность в поиске более надежных способов лечения мышечной дистрофии и других заболеваний, связанных с истощением мышц.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к соединениям, представленным формулой (I), или их фармацевтически приемлемым солям:



где

X представляет собой CR⁷ или N;

Y представляет собой S, O или SO₂;

Z представляет собой N или CR⁶;

каждый из R¹, R², R³, R⁴, R⁵ и R⁷ независимо представляет собой H, алкил, алкокси, галоген, нитрил, amino или aminoалкил;

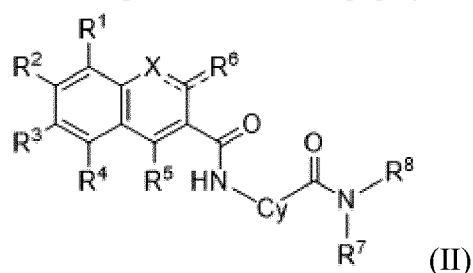
R⁶ представляет собой H или алкил;

Q представляет собой C=O, SO или SO₂;

Sy представляет собой арил или гетероарил; и

m равно 1-3.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к соединениям, представленным формулой (II), или их фармацевтически приемлемым солям:



где

X представляет собой O, N или NR⁹;

каждый из R¹, R², R³, R⁴ и R⁵ независимо представляет собой H, алкил, алкокси, галоген, нитрил, amino или aminoалкил;

R⁶ представляет собой H, =O или алкил;

Sy представляет собой арил или гетероарил;

каждый из R⁷ и R⁸ независимо представляет собой H или алкил, или вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют гетероцикл; и

R⁹ представляет собой H или алкил.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способы лечения или предотвращения заболевания, связанного с дисфункцией комплекса, связанного с дистрофином.

Краткое описание графических материалов

Фиг 1. Трубопровод для высокопроизводительного скрининга модуляторов саркоспана (SSPN). (a) Большие химические библиотеки подвергали скринингу с использованием линии репортерных клеток hSSPN-EGFP C2C12 (n=1). Первые 1000 попаданий были повторно проверены как в hSSPN-EGFP, так и в hSSPN-люциферазе C2C12 репортерных клеточных линиях (n=3 каждая). 63 из 1000 соединений увеличивали экспрессию репортера в обеих клеточных линиях и поэтому считались подтвержденными попаданиями. Подтвержденные попадания были разбиты на 3 группы на основе общих структурных особенностей: фармакофор 1 (PC1), фармакофор 2 (PC2) и другие, не имевшие объединяющей структурной темы. Клетки с дефицитом дистрофина H2K *mdx* обрабатывали

5,5 мкМ (b) фармакофора 1 (PC1) или (c) других соединений в течение 48 часов. Все клетки обрабатывали в день 2 дифференцировки и собирали через 48 часа после обработки. Экспрессию генов нормализовали до клеток, обработанных геном β -актина и носителем (0,5% ДМСО). Данные представляют собой отдельные копии и среднее значение. $n=3-8$. SSPN, саркоспан; R.U., относительные ед. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Фиг. 2. Подтвержденные попадания увеличивают экспрессию гена саркоспана и белка в мышечных трубочках *mdx*. (a) Относительная экспрессия гена саркоспана в клетках H2K *mdx* с дефицитом дистрофина, обработанных от 0,5 до 50 мкМ фармакофора 1 или других соединений в течение 48 часов. Экспрессию генов нормализовали до клеток, обработанных геном β -актина и носителем (0,2% ДМСО). Данные представлены в виде среднего значения+SEM. $n=3-6$. (b-c) Иммуноблот саркоспана клеток с дефицитом дистрофина H2K *mdx*, обработанных 2,5- 10 мкМ соединений в течение 48 часов. Все клетки обрабатывали в день 2 дифференцировки и собирали через 48 часа после обработки. Уровни белка саркоспана количественно определяли в ImageJ и нормализовали к GAPDH и обработанным носителем клеткам (0,2% ДМСО). Клеточные лизаты исследовали 2-4 раза в независимых вестерн-блоттингах. Показаны репрезентативные блоты. Показанная ниже количественная оценка иммуноблотов включает все эксперименты. Данные представляют собой отдельные копии и среднее значение. $n=3$ на концентрацию. SSPN, саркоспан; R.U., относительные ед. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Фиг. 3. ОТ-9 увеличивает экспрессию гена саркоспана в мышечных трубочках мышей дикого типа. В мышечных трубочках C2C12, обработанных в течение 48 часов 5 мкМ ОТ-9 и PC1-36, наблюдается увеличение экспрессии гена саркоспана. Экспрессию генов нормализовали до клеток, обработанных β -актином и носителем (0,1% ДМСО). Данные представляют собой отдельные копии и среднее значение. $n=3-27$. SSPN, саркоспан; R.U., относительные единицы **** $p < 0,0001$.

Фиг. 4. ОТ-9 увеличивает адгезионные комплексы, связывающие ламинин, на клеточной поверхности. Мышечные трубочки C2C12, обработанные носителем или 5 мкМ ОТ-9 в течение 48 часов, инкубировали в биотине, реагирующем с аминами, для мечения белков клеточной поверхности. Авидин использовали для аффинной очистки меченых белков перед иммуноблот-анализом с (a) антителами, распознающими ламинин-связывающий гликоэпитоп альфа-дистрогликана (α -DG (гликан)) или сердцевинный альфа-дистрогликан. (b) В клетках, обработанных ОТ-9, на поверхности клеток были увеличены как гликозилированный альфа-дистрогликан, так и сердцевинный альфа-дистрогликан. (c-d) Количественная оценка иммуноблотов. (e) Мышечные трубочки *mdx*, обработанные носителем или 5 мкМ ОТ-9 в течение 48 часов, инкубировали в биотине для мечения белков клеточной поверхности и аффинно очищали авидином. Иммуноблот-анализ показывает повышенную регуляцию атрофина, связанного с мечеными биотином белками клеточной поверхности. (f) Количественная оценка иммуноблота атрофина. Данные представляют собой отдельные копии и среднее значение. $n=3$. α - DG, альфа-дистрогликан; UTRN,

утрофин; R.U., относительные ед. * $p < 0,05$.

Фиг. 5. ОТ-9 улучшает стабильность мембран дистрофин-дефицитных мышечных трубочек частично за счет активации саркоспана. (а) Анализ высвобождения креатинкиназы (СК) влечет за собой осмотический шок мышечных трубочек, который вызывает набухание клеток и повреждение мембраны, что позволяет высвобождать внутриклеточный СК из клетки в окружающую среду. Высвобождение СК рассчитывают по соотношению $СК_{\text{внуклеточная}} / (СК_{\text{внуклеточная}} + СК_{\text{внутриклеточная}})$. День 2 (b) обработанные *mdx* обрабатывали в течение 48 часов 5 мкМ ОТ-9 и подвергали осмотическому шоку растворами в диапазоне от 28,5 до 224,5 миллиосмолей (мОсмол). (с) Мышечные трубочки *mdx* трансфицировали 24 или 48 нМ скремблированной миРНК или миРНК, нацеленной на саркоспан. Через 48 часов мышечные трубочки подвергали осмотическому шоку растворами с концентрацией 45 мОсмол. Транфекция 24 нМ SSPN миРНК не влияла на высвобождение СК по сравнению с контролем скремблирования. Концентрация 48 нМ миРНК саркоспана увеличивала высвобождение СК по сравнению с контролем скремблирования, указывая на то, что саркоспан способствует стабильности мембраны независимо от лечения (d) миотрубочки *mdx*, обработанные параллельно 24 нМ миРНК саркоспана и 10 мкМ ОТ-9, демонстрируют, что истощение саркоспана снижал способность ОТ-9 улучшать стабильность мембраны. Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM. $n=3$. SSPN, саркоспан; R.U., относительные ед. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Фиг. 6. ОТ-9 и ОТ-9m увеличивают количество мРНК саркоспана *in vitro* и *in vivo* в мышцах *mdx*. (а) Схематический обзор экспериментальной установки для проверки стабильности мРНК саркоспана *in vitro*. Мышечные трубочки C2C12 обрабатывали на второй день дифференцировки 5 мкМ ОТ-9. Через 4 часа среду, содержащую ОТ-9, удаляли и заменяли на свежую среду без соединения. Клетки собирали для анализа экспрессии генов сразу после смены среды (0 ч) и через 4 ч, 24 ч и 48 ч. (b) ОТ-9 индуцирует экспрессию гена саркоспана через 4 часа после обработки (0 ч). После продолжительного удаления соединения (4-48 ч) уровни мРНК саркоспана были одинаковыми в клетках, обработанных носителем и ОТ-9. (с) 20-недельным однопаметным самцам *mdx* вводили в обе передние большеберцовые мышцы носитель (5% ДМСО, 95% PBS) или 3 мг/кг мкг ОТ-9. Через 4 часа мышцы собирали и обрабатывали для анализа экспрессии генов. (d) Самцам старше 19-22 недель вводили в обе передние мышцы большеберцовой кости носитель (5% ДМСО, 95% PBS) или 3 мг/кг и 10 мг/кг ОТ-9m. Через 4 часа мышцы собирали и обрабатывали для анализа экспрессии генов. (е) 13-недельным самцам *mdx* подкожно вводили носитель (4% ПЭГ-200 в гидроксипропил- β -циклодекстрине) или 20 мг/кг/день ОТ-9m. После 13 дней обработки мышцы собирали и обрабатывали для анализа экспрессии генов. Экспрессию гена нормализовали для клеток, обработанных β -актином и носителем. Данные представляют собой отдельные повторы и среднее значение. $n=3$ для исследования *in vitro* и $n=2$ для исследования *in vivo*. SSPN, саркоспан; R.U., относительные единицы. ** $p < 0,01$.

Фиг. 7. Качество планшета. Надежная строго стандартизированная разность

средних (SSMD*) использовалась для оценки качества планшета и выбора попаданий.

Фиг. 8. ОТ-9 увеличивает дифференцировку в мышечных трубочках *mdx*. Мышечные трубочки *mdx* обрабатывали 1, 5 и 10 мкМ ОТ-9 на 2-й день и анализировали на 4-й день дифференцировки. (a-b) ОТ-9 индуцирует небольшое увеличение дифференцировки мышечных трубочек H2K *mdx*, что измеряется индексом слияния, и (c) экспрессией гена миогенина. Данные представляют собой отдельные повторы и среднее значение. n=3. Масштабная линейка=200 мкм. MYOG, миогенин; R.U., относительные единицы *p<0,05, **p<0,01.

Фиг. 9. ОТ-9 эффективен в отношении множественных линий миобластов. (a) Миобласты C2C12, (b) H2K WT и (c) H2K *mdx* реагируют на ОТ-9, но не на PC1-36. Миобласты обрабатывали в течение 24 часов 1, 5 и 10 мкМ ОТ-9 или PC1-36. Экспрессию генов нормализовали до клеток, обработанных β-актином и носителем (0,1% ДМСО). Данные представляют собой отдельные копии и среднее значение. n=3-6. SSPN, саркоспан; R.U., относительные ед. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

Фиг. 10. Создание и проверка анализа репортерного белка C2C12 SSPN-HiBiT.

10 (a) Схема топологии саркоспана в сарколемме с 11-аминокислотным HiBiT, слитым с N-концом саркоспана. 10(b) Уровни белка SSPN-HiBiT увеличиваются по мере дифференцировки. 10(c) Мышечные трубочки SSPN-HiBiT реагируют на положительный контроль, GW5074, ингибитор с-гаф. Расчет качества планшета с использованием GW5074 в качестве положительного контроля с использованием надежного строго стандартизированного среднего отклонения (SSMD*) дает SSMD* 2,48, что указывает на превосходный умеренный контроль. 10(d) Анализы в 12-луночном и 384-луночном форматах SSPN-HiBiT обнаруживают увеличение репортерной экспрессии после обработки ОТ-9. Клетки SSPN-HiBiT обрабатывали на 2-й день и собирали на 4-й день дифференцировки. R.U.=относительные единицы, нормализованные к контрольному растворителю (ДМСО), концентрации белка для анализа с 12 лунками или подсчету ядер для анализа с 384 лунками. Показанные данные представляют собой средние значения ± SEM. n=6. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Фиг. 11. ОТ-9 увеличивает связывающие ламинин белки адгезии в общем лизате.

Мышечные трубочки C2C12 обрабатывали носителем или 5 мкМ ОТ-9 в течение 48 часов перед иммуноблот-анализом. (a) В клетках, обработанных ОТ-9, не наблюдалось увеличения содержания полностью гликозилированного ламинин-связывающего альфа-дистрогликана (α-DG (гликан)), но наблюдалось увеличение корового альфа-дистрогликана. GAPDH показан как контроль загрузки. (b-c) Количественная оценка иммуноблотов. Данные представляют собой отдельные повторы и среднее значение. n=3. R.U., относительные единицы, нормализованные к GAPDH и контролю носителя.

Фиг. 12. Опосредованный миРНК нокдаун SSPN приводит к эффективности нокдауна 76%.

Мышечные трубочки *mdx* обрабатывали параллельно 1, 5 и 10 мкМ ОТ-9 и 24 нМ скремблированной контрольной миРНК или миРНК, нацеленной на мРНК SSPN.

Экспрессию гена нормализовали для клеток, обработанных β -актином и носителем и скремблированной миРНК. Данные представляют собой среднее+SEM. $n=3$. SSPN, саркоспан; R.U., относительные единицы. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, **** $p<0,0001$.

Фиг. 13. Период полураспада 1 мкМ ОТ-9 и PC1-36 в плазме крови мыши CD-1.

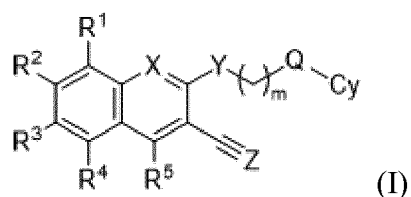
Фиг. 14. Период полураспада 1 мкМ ОТ-9 и PC1-36 в PBS, pH 7,4.

Подробное описание изобретения

Гетерогенность мутаций и сложность доставки в мышцы являются основными проблемами при разработке методов лечения DMD. Существует острая необходимость в улучшенных способах лечения, которые могут решить эти проблемы. Саркоспан (SSPN) уменьшает патологию мышечной дистрофии в мышечной модели DMD за счет увеличения мембранной локализации атрофин-гликопротеинового комплекса (UGC) и адгезионных комплексов $\alpha 7\beta 1$ -интегрин, эффективно увеличивая связывание ламинина для компенсации потери дистрофина.

Разработка низкомолекулярных препаратов, повышающих экспрессию SSPN, может привести к созданию автономных или комбинированных способом лечения DMD и других форм мышечной дистрофии, вызванных дефицитом мембранных белков. Терапия с использованием малых молекул идеальна из-за их способности обходить ограничения доставки и иммунного ответа, наблюдаемые при вирусных и клеточных методах.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к соединениям, представленным формулой (I), или их фармацевтически приемлемым солям:



где

X представляет собой CR⁷ или N;

Y представляет собой S, O или SO₂;

Z представляет собой N или CR⁶;

каждый из R¹, R², R³, R⁴, R⁵ и R⁷ независимо представляет собой H, алкил, алкокси, галоген, нитрил, amino или aminoалкил;

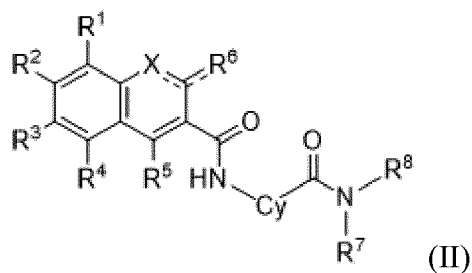
R⁶ представляет собой H или алкил;

Q представляет собой C=O, SO или SO₂;

Cy представляет собой арил или гетероарил; и

m равно 1-3.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к соединениям, представленным формулой (II), или их фармацевтически приемлемым солям:



где

X представляет собой O, N или NR⁹;

каждый из R¹, R², R³, R⁴ и R⁵ независимо представляет собой H, алкил, алкокси, галоген, нитрил, amino или aminoалкил;

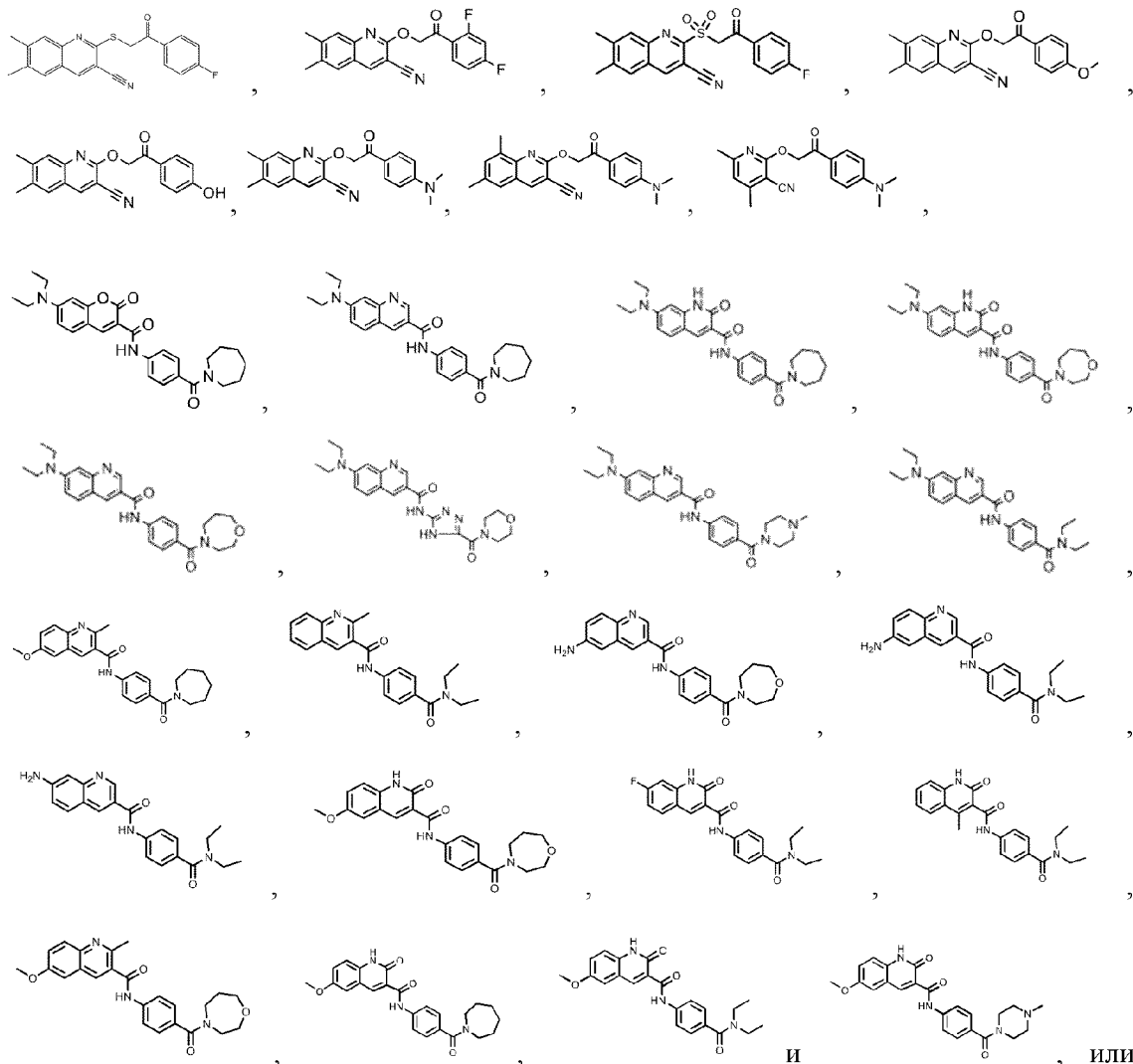
R⁶ представляет собой H, =O или алкил;

Sy представляет собой арил или гетероарил;

каждый из R⁷ и R⁸ независимо представляет собой H или алкил, или вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют гетероцикл; и

R⁹ представляет собой H или алкил.

В определенных вариантах осуществления соединение выбрано из:



фармацевтически приемлемая соль.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает композицию, содержащую соединение по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способы лечения или предотвращения заболевания, связанного с дисфункцией комплекса, связанного с дистрофином, у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту соединения по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли.

В определенных вариантах осуществления заболевание, связанное с дисфункцией комплекса, связанного с дистрофином, представляет собой мышечную дистрофию.

Фармацевтические композиции

Композиции и способы по настоящему изобретению могут применяться для лечения индивидуума, нуждающегося в этом. В определенных вариантах осуществления индивидуум представляет собой млекопитающее, такое как человек, или млекопитающее, не являющееся человеком. При введении животному, такому как человек, композицию или соединение предпочтительно вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, соединения по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемые носители хорошо известны в данной области техники и включают, например, водные растворы, такие как вода или физиологически забуференный солевой раствор, или другие растворители или носители, такие как гликоли, глицерин, масла, такие как оливковое масло, или органические сложные эфиры для инъекций. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, когда такие фармацевтические композиции предназначены для введения человеку, особенно для инвазивных путей введения (то есть путей, таких как инъекция или имплантация, которые обеспечивают преодолевающий перенос или диффузию через эпителиальный барьер), водный раствор не содержит пирогенов или практически не содержит пирогенов. Вспомогательные вещества могут быть выбраны, например, для обеспечения замедленного высвобождения агента или для избирательного воздействия на одну или несколько клеток, тканей или органов. Фармацевтическая композиция может находиться в стандартной лекарственной форме, такой как таблетка, капсула (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), гранула, лиофилизат для восстановления, порошок, раствор, сироп, суппозиторий, инъекция и т. п. Композиция также может находиться в системе для трансдермальной доставки, например, на кожном пластыре. Композиция также может присутствовать в растворе, подходящем для местного применения, таком как лосьон, крем или мазь.

Фармацевтически приемлемый носитель может содержать физиологически приемлемые агенты, которые действуют, например, для стабилизации, увеличения растворимости или увеличения абсорбции соединения, такого как соединение изобретения. Такие физиологически приемлемые агенты включают, например, углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или

глутатион, хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки или другие стабилизаторы или вспомогательные вещества. Выбор фармацевтически приемлемого носителя, в том числе физиологически приемлемого агента, зависит, например, от пути введения композиции. Препарат или фармацевтическая композиция может представлять собой самоэмульгирующуюся систему доставки лекарственного средства или самомикрoэмульгирующуюся систему доставки лекарственного средства. Фармацевтическая композиция (препарат) также может представлять собой липосому или другую полимерную матрицу, в которую может быть включено, например, соединение изобретения. Липосомы, например, которые содержат фосфолипиды или другие липиды, представляют собой нетоксичные, физиологически приемлемые и метаболизируемые носители, которые относительно просто изготавливать и вводить.

Фраза «фармацевтически приемлемый» применяется в настоящем документе для обозначения таких соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые в рамках рационального медицинского решения, являются подходящими для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соразмерно разумному соотношению пользы/риска.

Фраза «фармацевтически приемлемый носитель» в контексте настоящего документа означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество, растворитель или инкапсулирующий материал. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в том смысле, что он совместим с другими ингредиентами состава и не причиняет вреда пациенту. Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее производные, такие как натрийкарбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошкообразный трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) тальк; (8) эксципиенты, такие как масло какао и воск для суппозиториев; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) апирогенную воду; (17) изотонический раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) фосфатно-буферные растворы; и (21) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

Фармацевтическую композицию (препарат) можно вводить субъекту любым из ряда способов введения, включая, например, пероральное введение (например, капли, как в водных или неводных растворах или суспензиях, таблетки, капсулы (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), болусы, порошки, гранулы, пасты для нанесения на

язык); всасывание через слизистую оболочку полости рта (например, сублингвально); подкожно; трансдермально (например, в виде пластыря, нанесенного на кожу); и местно (например, в виде крема, мази или спрея, нанесенных на кожу). Соединение также можно составлять для ингаляции. В определенных вариантах осуществления соединения можно просто растворять или суспендировать в стерильной воде. Подробности подходящих путей введения и подходящих для них композиций можно найти, например, в патентах США №№ 6,110,973, 5,763,493, 5,731,000, 5,541,231, 5,427,798, 5,358,970 и 4,172,896, а также в цитированных в них патентах.

Составы можно удобно предоставлять в стандартной дозированной форме и можно получать любыми способами, хорошо известными в области фармации. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом-носителем для получения единичной дозированной формы, будет варьироваться в зависимости от организма, который лечат, конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом-носителем для получения разовой лекарственной формы, обычно будет таким количеством соединения, которое оказывает терапевтическое действие. В общем случае из ста процентов это количество составляет от около 1 до около девяноста девяти процентов активного ингредиента, предпочтительно от около 5 до около 70 процентов, наиболее предпочтительно от около 10 до около 30 процентов.

Способы приготовления этих составов или композиций включают стадию объединения активного соединения, такого как соединение изобретения, с носителем и, необязательно, одним или более дополнительными ингредиентами. Как правило, составы готовят путем однородного и тесного связывания соединения настоящего изобретения с жидкими носителями, или тонкоизмельченными твердыми носителями, или обоими, а затем, при необходимости, формованием продукта.

Композиции изобретения, подходящие для перорального введения, могут быть в форме капсул (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), крахмальных капсул, пилюль, таблеток, леденцов (с использованием ароматизированной основы, обычно сахарозы и гуммиарабика или трагаканта), лиофильных препаратов, порошков, гранул или в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости, или в виде жидкой эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле, или в виде эликсира или сиропа, или в виде пастилок (с использованием инертной основы, такой как желатин и глицерин, или сахароза и гуммиарабик) и/или в виде средств для полоскания рта и тому подобного, каждая из которых содержит заранее определенное количество соединения настоящего изобретения в качестве активного ингредиента. Композиции или соединения также можно вводить в виде болюса, электуария или пасты.

Для приготовления твердых дозированных форм для перорального введения (капсулы (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), таблетки, пилюли, драже, порошки, гранулы и тому подобное) активный ингредиент смешивают с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или

фосфат дикальция, и/или любым из следующего: (1) наполнители или добавки, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связывающие вещества, такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или гуммиарабик; (3) увлажнители, такие как глицерин; (4) разрыхлители, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или крахмал из тапиоки, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия; (5) замедляющие растворение агенты, такие как парафин; (6) ускорители абсорбции, такие как четвертичные аммониевые соединения; (7) смачивающие агенты, такие как, например, цетиловый спирт и моностеарат глицерина; (8) абсорбенты, такие как каолин и бентонитовая глина; (9) смазывающие вещества, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси; (10) комплексообразующие агенты, такие как модифицированные и немодифицированные циклодекстрины; и (11) красители. В случае капсул (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), таблеток и пилюль фармацевтические композиции также могут содержать буферные агенты. Твердые композиции аналогичного типа также можно использовать в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах с использованием таких вспомогательных веществ, как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т. п.

Таблетку можно получать путем прессования или формовки, необязательно, с одним или несколькими вспомогательными ингредиентами. Прессованные таблетки могут быть приготовлены с использованием связующего вещества (например, желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы), смазывающего вещества, инертного разбавителя, консерванта, разрыхлителя (например, крахмалгликолята натрия или поперечно-сшитой карбоксиметилцеллюлозы натрия), поверхностно-активного или диспергирующего агента. Формованные таблетки можно изготавливать путем формования в подходящей машине смеси порошкообразного соединения, смоченного инертным жидким разбавителем.

Таблетки и другие твердые лекарственные формы фармацевтических композиций, такие как драже, капсулы (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), пилюли и гранулы, могут быть необязательно с насечкой или приготовлены с покрытиями и оболочками, такими как кишечнорастворимые покрытия и другие покрытия, хорошо известные в области фармацевтики. Они также могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечить медленное или контролируемое высвобождение в нем активного ингредиента с использованием, например, гидроксипропилметилцеллюлозы в различных пропорциях, чтобы обеспечить желаемый профиль высвобождения, другие полимерные матрицы, липосомы и/или микросферы. Их можно стерилизовать, например, путем фильтрации через удерживающий бактерии фильтр или путем включения стерилизующих агентов в виде стерильных твердых композиций, которые можно растворять в стерильной воде или какой-либо другой стерильной среде для инъекций непосредственно перед использованием. Эти композиции также могут необязательно содержать замутнители и могут иметь такую композицию, чтобы высвободить активный(е) ингредиент(ы) только

или предпочтительно в определенной части желудочно-кишечного тракта, необязательно замедленным образом. Примеры заливочных композиций, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски. Активный ингредиент также может находиться в микрокапсулированной форме, при необходимости, с одним или более из вышеописанных эксципиентов.

Жидкие лекарственные формы, пригодные для перорального введения, включают фармацевтически приемлемые эмульсии, лиофильные препараты для разведения, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активному ингредиенту жидкие лекарственные формы могут содержать обычно используемые в данной области техники инертные разбавители, такие как, например, вода или другие растворители, циклодекстрины и их производные, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, масло зародышей пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана и их смеси.

Помимо инертных разбавителей, композиции для ухода за полостью рта могут также включать вспомогательные вещества, такие как смачивающие агенты, эмульгирующие и суспендирующие агенты, подсластители, ароматизаторы, красители, отдушки и консерванты.

Суспензии, в дополнение к активным соединениям, могут содержать суспендирующие агенты, такие как, например, этоксилированные изостеариловые спирты, сложные эфиры полиоксиэтиленсорбита и сорбитана, микрокристаллическую целлюлозу, метакрилат алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант и их смеси.

Лекарственные формы для местного или трансдермального введения включают порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и ингаляторы. Активное соединение можно смешивать в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или пропеллентами, которые могут быть необходимы.

Мази, пасты, кремы и гели могут содержать в дополнение к активному соединению вспомогательные вещества, такие как животные и растительные жиры, масла, воски, парафины, крахмал, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы, бентониты, кремниевую кислоту, тальк и оксид цинка или их смеси.

Порошки и аэрозоли могут содержать, в дополнение к активному соединению, вспомогательные вещества, такие как лактоза, тальк, кремниевая кислота, гидроксид алюминия, силикаты кальция и порошок полиамидов, или смеси этих веществ. Спреи могут дополнительно содержать обычные пропелленты, такие как хлорфторуглеводороды и летучие незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан.

Трансдермальные пластыри имеют дополнительное преимущество, заключающееся в обеспечении контролируемой доставки соединения настоящего изобретения в организм.

Такие лекарственные формы можно получать путем растворения или диспергирования активного соединения в соответствующей среде. Усилители всасывания также можно использовать для повышения потока соединения через кожу. Скорость такого потока можно регулировать с помощью регулирующей скорости мембраны или путем диспергирования соединения в полимерной матрице или геле.

Фразы «парентеральное введение» и «введенный парентерально», используемые в данном документе, означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную и интратермальную инъекцию и инфузию. Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, содержат одно или несколько активных соединений в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями или стерильными порошками, которые могут быть преобразованы в стерильные растворы или дисперсии для инъекций непосредственно перед применением, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты, растворенные вещества, которые делают состав изотоническим с кровью предполагаемого реципиента, или суспендирующие или загущающие агенты.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут использоваться в фармацевтических композициях изобретения, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования материалов для покрытия, таких как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и за счет использования поверхностно-активных веществ.

Эти композиции также могут содержать вспомогательные вещества, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предупреждение действия микроорганизмов может быть обеспечено включением в состав различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабенов, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. Также может быть желательным включение в композиции изотонических агентов, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, пролонгированное всасывание инъекционной фармацевтической формы можно обеспечить включением агентов, замедляющих всасывание, таких как моностеарат алюминия и желатин.

В некоторых случаях для пролонгирования действия лекарственного средства, желательно замедлять абсорбцию лекарственного средства при подкожной или внутримышечной инъекции. Этого можно достичь путем использования жидкой суспензии

кристаллического или аморфного материала, плохо растворимого в воде. Тогда скорость всасывания лекарства зависит от скорости его растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера и формы кристаллов. В альтернативном варианте замедленное всасывание парентерально вводимой лекарственной формы обеспечивают путем растворения или суспендирования лекарственного средства в масляном носителе.

Инъекционные депо-формы получают путем формирования микрокапсулированных матриц рассматриваемых соединений в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения лекарственного средства и полимера и природы конкретного используемого полимера можно контролировать скорость высвобождения лекарственного средства. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают сложные поли(ортоэфиры) и поли(ангидриды). Инъекционные депо-составы также получают путем включения лекарственного средства в липосомы или микроэмульсии, совместимые с тканями организма.

Для использования в способах этого изобретения активные соединения могут быть даны сами по себе или в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, от 0,1 до 99,5% (более предпочтительно от 0,5 до 90%) активного ингредиента в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

Способы введения могут также обеспечиваться перезаряжаемыми или биоразлагаемыми устройствами. В последние годы были разработаны и протестированы *in vivo* различные полимерные устройства для медленного - высвобождением для контролируемой доставки лекарственных средств, включая белковые биофармацевтические препараты. Ряд биосовместимых полимеров (включая гидрогели), включая как биоразлагаемые, так и неразлагаемые полимеры, можно использовать для формирования имплантата для замедленного высвобождения соединения в конкретном целевом участке.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях можно варьировать, чтобы получить количество активного ингредиента, эффективное для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не оказывая при этом токсического воздействия на пациента.

Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества факторов, включая активность конкретного используемого соединения или комбинации соединений или их сложного эфира, соли или амида, путь введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого(ых) соединения(й), продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с применяемыми конкретным(ыми) соединением(ями), возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и предшествующую историю болезни пациента, которого лечат, и подобные факторы, хорошо известные в данной области медицины.

Врач или ветеринар, имеющий обычные навыки в данной области, может легко определять и назначать терапевтически эффективное количество требуемой

фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начать введение доз фармацевтической композиции или соединения с более низких уровней, чем требуется для достижения необходимого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозу до тех пор, пока не будет достигнут необходимый эффект. Под «терапевтически эффективным количеством» подразумевается концентрация соединения, которая является достаточной для достижения необходимого терапевтического эффекта. В общем случае понятно, что эффективное количество соединения будет варьироваться в зависимости от массы, пола, возраста и анамнеза субъекта. Другие факторы, которые влияют на эффективное количество, могут включать, помимо прочего, тяжесть состояния пациента, расстройство, которое лечат, стабильность соединения и, если желательно, другой тип терапевтического средства, вводимого с соединением по настоящему изобретению. Большую общую дозу можно доставлять путем многократного введения агента. Способы определения эффективности и дозировки известны специалистам в данной области техники (Isselbacher et al. (1996) *Harrison's Principles of Internal Medicine* 13 ed., 1814-1882, включенный в настоящий документ посредством ссылки).

В общем, подходящая суточная доза активного соединения, используемого в композициях и способах изобретения, будет представлять собой такое количество соединения, которое является самой низкой дозой, эффективной для получения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза обычно будет зависеть от факторов, описанных выше.

При желании эффективную суточную дозу активного соединения можно вводить в виде одной, двух, трех, четырех, пяти, шести или более субдоз, вводимых отдельно с соответствующими интервалами в течение дня, необязательно, в единичных дозированных формах. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения активное соединение можно вводить два или три раза в день. В предпочтительных вариантах осуществления активное соединение вводят один раз в день.

Пациентом, получающим такое лечение, является любое нуждающееся животное, включая приматов, в частности людей; и другие млекопитающие, такие как лошади, крупный рогатый скот, свиньи, овцы, кошки и собаки; птицы; и домашние животные в целом.

В определенных вариантах осуществления соединения изобретения могут вводиться отдельно или совместно с терапевтическим агентом другого типа.

Настоящее описание включает использование фармацевтически приемлемых солей соединений изобретения в композициях и способах настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления рассматриваемые соли изобретения включают, но не ограничиваются ими, соли алкила, диалкила, триалкила или тетраалкиламмония. В некоторых вариантах осуществления рассматриваемые соли изобретения включают, но не ограничиваются ими, L-аргинин, бенентамин, бензатин, бетаин, гидроксид кальция, холин, деанол, диэтаноламин, диэтиламин, 2-(диэтиламино)этанол, этаноламин, этилендиамин, N-метилглюкамин, гидрабамин, 1H-имидазол, литий, L-лизин, магний, 4-(2-

гидроксиэтил)морфолин, пиперазин, калий, 1-(2-гидроксиэтил)пирролидин, натрий, триэтаноламин, трометамин и соли цинка. В некоторых вариантах осуществления предполагаемые соли изобретения включают, но не ограничиваются ими, соли Na, Ca, K, Mg, Zn или других металлов. В некоторых вариантах предполагаемые соли изобретения включают, но не ограничиваются ими, 1-гидрокси-2-нафтойную кислоту, 2,2-дихлоруксусную кислоту, 2-гидроксиэтансульфоновую кислоту, 2-оксоглутаровую кислоту, 4-ацетамидобензойную кислоту, 4-аминосалициловую кислоту, уксусную кислоту, адипиновую кислоту, 1-аскорбиновую кислоту, 1-аспарагиновую кислоту, бензолсульфоновую кислоту, бензойную кислоту, (+)- камфорную кислоту, (+)- камфор-10-сульфоокислоту, каприновую кислоту (декановая кислота), капроновую кислоту (гексановая кислота), каприловую кислоту (октановая кислота), угольную кислоту, коричную кислоту, лимонную кислоту, цикламиновую кислоту, додецилсульфоновую кислоту, этан-1,2-дисульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, муравьиную кислоту, фумаровую кислоту, галактаровую кислоту, гентизиновую кислоту, d-глюкогептоновую кислоту, d-глюконовую кислоту, d-глюкуроновую кислоту, глутаминовую кислоту, глутаровую кислоту, глицерофосфорную кислоту, гликолевую кислоту, гиппуровую кислоту, бромистоводородную кислоту, соляную кислоту, изомасляную кислоту, молочную кислоту, лактобионовую кислоту, лауриновую кислоту, малеиновую кислоту, 1-яблочную кислоту, малоновую кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, нафталин-1,5-дисульфоновую кислоту, нафталин-2-сульфоновую кислоту, никотиновую кислоту, азотную кислоту, олеиновую кислоту, щавелевую кислоту, пальмитиновую кислоту, памовую кислоту, фосфорную кислоту, пропионовую кислоту, 1-пироглутаминовую кислоту, салициловую кислоту, себациновую кислоту, стеариновую кислоту, янтарную кислоту, серную кислоту, 1-винную кислоту, тиоциановую кислоту, п-толуолсульфоновую кислоту, трифторуксусную кислоту и соли ундециленовой кислоты.

Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот также могут существовать в виде различных сольватов, таких как вода, метанол, этанол, диметилформамид и тому подобное. Также можно приготовить смеси таких сольватов. Источником такого сольвата может быть растворитель кристаллизации, присущий растворителю для получения или кристаллизации, или не присущий такому растворителю.

В композициях также могут присутствовать увлажняющие агенты, эмульгаторы и смазывающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, антиадгезивные агенты, покрытия, подсластители, вкусовые добавки и ароматизаторы, консерванты и антиоксиданты.

Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают в себя: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и тому подобное; (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и тому подобное; и (3) металлохелатирующие агенты, такие как лимонная

кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и тому подобное.

Определения

Если в настоящем документе не определено иное, научные и технические термины, используемые в настоящей заявке, должны иметь значения, которые обычно понимаются средними специалистами в данной области техники. Как правило, номенклатура, используемая в связи с химическими методами, методиками культуры клеток и тканей, молекулярной биологии, клеточной и онкологической биологии, нейробиологии, нейрохимии, вирусологии, иммунологии, микробиологии, фармакологии, генетики и химии белков и нуклеиновых кислот, описанными в настоящем документе, хорошо известны и широко используются в данной области.

Способы и методики настоящего описания, как правило, выполняются, если не указано иное, в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области техники и описанными в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в данном описании. См., например, "Principles of Neural Science", McGraw-Hill Medical, New York, N.Y. (2000); Motulsky, "Intuitive Biostatistics", Oxford University Press, Inc. (1995); Lodish et al., "Molecular Cell Biology, 4th ed.", W. H. Freeman & Co., New York (2000); Griffiths et al., "Introduction to Genetic Analysis, 7th ed.", W. H. Freeman & Co., N.Y. (1999); и Gilbert et al., "Developmental Biology, 6th ed.", Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (2000).

Химические термины, используемые в настоящем документе, если в данном документе не указано иное, используются в соответствии с общепринятым применением в данной области техники, как показано на примерах в "The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms", Parker S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco, C.A. (1985).

Все вышеперечисленное и любые другие публикации, патенты и опубликованные патентные заявки, упомянутые в данной заявке, специально включены в настоящий документ посредством ссылки. В случае конфликта настоящее описание, включая его конкретные определения, будет иметь преимущественную силу.

Термин «агент» используется здесь для обозначения химического соединения (такого как органическое или неорганическое соединение, смесь химических соединений), биологической макромолекулы (такой как нуклеиновая кислота, антитело, включая их части, а также гуманизированные, химерные и человеческие антитела и моноклональные антитела, белок или его часть, например, пептид, липид, углевод), или экстракт, полученный из биологических материалов, таких как клетки бактерий и клетки или ткани, растений, грибов или животных (особенно млекопитающих). Агенты включают в себя, например, агенты, структура которых известна, и агенты, структура которых неизвестна. Способность таких агентов ингибировать AR или способствовать деградации AR может сделать их пригодными в качестве «терапевтических агентов» в способах и композициях настоящего изобретения.

«Пациент», «субъект» или «индивидуум» используются взаимозаменяемо и

относятся к человеку или животному, не являющемуся человеком. Эти термины включают в себя млекопитающих, таких как люди, приматы, сельскохозяйственные животные (включая коров, свиней и т. д.), домашние животные (например, собаки, кошки и т. д.) и грызуны (например, мыши и крысы).

«Лечение» состояния или пациента означает принятие мер для получения полезных или желаемых результатов, включая клинические результаты. В контексте настоящего документа и как хорошо известно в данной области, «лечение» представляет собой подход для получения благоприятных или желательных результатов, включая клинические результаты. Полезные или желательные клинические результаты могут включать, но не ограничиваются такими как, ослабление или улучшение одного или нескольких симптомов или состояний, уменьшение степени заболевания, стабилизированное (то есть не ухудшающееся) состояние заболевания, предотвращение распространения заболевания, задержка или замедление развития заболевания, улучшение или временное смягчение болезненного состояния и ремиссия (частичная или полная), определяемая или не обнаруживаемая. «Лечение» также может означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения.

Термин «предотвращение» является общепризнанным в данной области техники, и при использовании в отношении состояния, такого как местное рецидивирование (например, боль), заболевания, такого как рак, синдрома комплекса, такого как сердечная недостаточность, или любого другого медицинского состояния, хорошо понимается в данной области техники и включает введение композиции, которая уменьшает частоту или замедляет появление симптомов медицинского состояния у субъекта по сравнению с субъектом, который не получает композиции. Таким образом, профилактика рака включает, например, уменьшение количества обнаруживаемых раковых образований в популяции пациентов, получающих профилактическое лечение по сравнению с нелеченной контрольной популяцией, и/или задержку появления выявляемых раковых образований в леченной популяции по сравнению с нелечеными контрольными популяциями, например, статистически и/или клинически значимым количеством.

«Применение» или «введение» вещества, соединения или агента субъекту может осуществляться с использованием одного из множества способов, известных специалистам в данной области техники. Например, соединение или агент можно вводить внутривенно, артериально, внутрикочно, внутримышечно, внутрибрюшинно, подкожно, через глаза, сублингвально, перорально (путем приема внутрь), интраназально (путем ингаляции), внутриспинально, интрацеребрально и трансдермально (путем абсорбции, например через кожный проток). Соединение или агент также можно соответствующим образом вводить с помощью перезаряжаемых или биоразлагаемых полимерных устройств или других устройств, например пластырей и насосов, или составов, которые обеспечивают пролонгированное, медленное или контролируемое высвобождение соединения или агента. Введение также может выполняться, например, один раз, множество раз и/или в течение одного или более продолжительных периодов.

Подходящие способы введения вещества, соединения или агента субъекту также будут зависеть, например, от возраста и/или физического состояния субъекта и химических и биологических свойств соединения или агента (например, растворимости, усвояемости, биодоступности, стабильности и токсичности). В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение или агент вводят перорально, например, субъекту путем приема внутрь. В некоторых вариантах осуществления изобретения перорально вводимое соединение или агент находится в составе с пролонгированным или медленным высвобождением или вводится с использованием устройства для такого медленного или пролонгированного высвобождения.

Используемое в данном документе выражение «совместное введение» относится к любой форме введения двух или нескольких различных терапевтических агентов, так что второй агент вводят, в то время как ранее введенный терапевтический агент все еще эффективен в организме (например, два агента являются одновременно эффективными у пациента, что может включать синергетическое действие двух агентов). Например, различные терапевтические соединения могут вводиться либо в одной и той же композиции, либо в отдельных композициях, одновременно или последовательно. Таким образом, индивидуум, который получает такое лечение, может получить пользу от комбинированного действия различных терапевтических агентов.

«Терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» лекарственного средства или агента представляет собой количество лекарственного средства или агента, которое при введении субъекту будет иметь предполагаемый терапевтический эффект. Полный терапевтический эффект необязательно возникает при введении одной дозы и может происходить только после введения серии доз. Таким образом, терапевтически эффективное количество может быть введено за одно или несколько введений. Точное эффективное количество, необходимое для субъекта, будет зависеть, например, от размера, состояния здоровья и возраста субъекта, а также от характера и степени тяжести состояния, подвергаемого лечению, такого как рак или MDS. Специалист может легко определять эффективное количество для данной ситуации путем рутинных экспериментов.

В контексте данного документа «необязательный» или «необязательно» означает, что описанное после этого событие или обстоятельство может произойти или не произойти, и что описание включает случаи, когда происходит событие или обстоятельство, а также случаи, в которых этого не происходит. Например, «необязательно замещенный алкил» относится к алкилу, который может быть замещенным, и к таковому, где алкил не замещен.

Понятно, что заместители и схемы замещения в соединениях по данному изобретению могут быть выбраны специалистом с обычной квалификацией в данной области техники для получения химически стабильных соединений, которые можно легко синтезировать методами, известными в данной области техники, а также указанными способами ниже, из легкодоступных исходных материалов. Если заместитель сам замещен более чем одной группой, понятно, что эти множественные группы могут находиться на

одном и том же атоме углерода или на разных атомах углерода, при условии, что в результате получается стабильная структура.

Термин «необязательно замещенный», как он используется в данном документе, относится к замене от одного до шести водородных радикалов в данной структуре радикалом указанного заместителя, включая, но не ограничиваясь ими: гидроксил, гидроксиалкил, алкокси, галоген, алкил, нитро, силил, ацил, ацилокси, арил, циклоалкил, гетероциклил, amino, аминоалкил, циано, галогеналкил, галогеналкокси, $-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{O}-$ алкил, $-\text{OP}(\text{O})(\text{O}-\text{алкил})_2$ или $-\text{CH}_2-\text{OP}(\text{O})(\text{O}-\text{алкил})_2$. Предпочтительно «необязательно замещенный» относится к замене от одного до четырех водородных радикалов в данной структуре заместителями, упомянутыми выше. Более предпочтительно от одного до трех водородных радикалов заменяют заместителями, как указано выше. Понятно, что заместитель может быть дополнительно замещен.

Термин «алкил», как он используется в данном документе, относится к насыщенным алифатическим группам, включая, но не ограничиваясь ими, C_1 -10 алкильные группы с неразветвленной цепью или C_1 - C_{10} алкильные группы с разветвленной цепью. Предпочтительно термин «алкильная» группа относится к C_1 - C_6 алкильным группам с неразветвленной цепью или C_1 - C_6 алкильным группам с разветвленной цепью. Наиболее предпочтительно термин «алкильная» группа относится к C_1 - C_4 алкильным группам с неразветвленной цепью или C_1 - C_4 алкильным группам с разветвленной цепью. Примеры «алкила» включают, но не ограничиваются ими, метил, этил, 1-пропил, 2-пропил, н-бутил, втор-бутил, трет-бутил, 1-пентил, 2-пентил, 3-пентил, нео-пентил, 1-гексил, 2-гексил, 3-гексил, 1-гептил, 2-гептил, 3-гептил, 4-гептил, 1-октил, 2-октил, 3-октил или 4-октил и т.п. «Алкильная» группа может быть необязательно замещенной.

Термин «ацил» известен в данной области техники и относится к группе, представленной общей формулой гидрокарбил $\text{C}(\text{O})-$, предпочтительно алкил $\text{C}(\text{O})-$.

Термин «ациламино» известен в данной области техники и относится к аминогруппе, замещенной ацильной группой, и может быть представлен, например, формулой гидрокарбил $\text{C}(\text{O})\text{NH}-$.

Термин «ацилокси» известен в данной области техники и относится к группе, представленной общей формулой гидрокарбил $\text{C}(\text{O})\text{O}-$, предпочтительно алкил $\text{C}(\text{O})\text{O}-$.

Термин «алкокси» относится к алкильной группе, имеющей присоединенный к ней кислород. Типичные алкоксигруппы включают метокси, этокси, пропокси, трет-бутокси и т. п.

Термин «алкоксиалкил» относится к алкильной группе, замещенной алкоксигруппой, и может быть представлен общей формулой алкил- O -алкил.

Термин «алкил» относится к насыщенным алифатическим группам, включая алкильные группы с неразветвленной цепью, алкильные группы с разветвленной цепью, циклоалкильные (алициклические) группы, алкилзамещенные циклоалкильные группы и циклоалкилзамещенные алкильные группы. В предпочтительных вариантах реализации алкил с неразветвленной или разветвленной цепью имеет 30 или менее атомов углерода в

своей основной цепи (например, C₁₋₃₀ для неразветвленных цепей, C₃₋₃₀ для разветвленных цепей) и более предпочтительно 20 или менее.

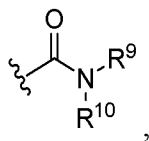
Кроме того, термин «алкил», используемый в описании, примерах и формуле изобретения, предназначен для включения как незамещенных, так и замещенных алкильных групп, последняя из которых относится к алкильным фрагментам, имеющим заместители, замещающие водород в одном или более атомах углерода углеводородной цепи, включая галогеналкильные группы, такие как трифторметил и 2,2,2-трифторэтил и т.д.

Термин «C_{x-y}» или «C_x-C_y», когда он используется в сочетании с химическим фрагментом, таким как ацил, ацилокси, алкил, алкенил, алкинил или алкокси, подразумевает включение групп, которые содержат от x до y атомов углерода в цепи. C₀ алкил означает водород, где группа находится в концевом положении, связь, если она внутренняя. C₁₋₆алкильная группа, например, содержит от одного до шести атомов углерода в цепи.

Термин «алкиламино» в контексте данного документа относится к аминогруппе, замещенной по меньшей мере одной алкильной группой.

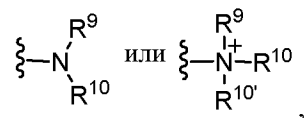
Термин «алкилтио» в контексте данного документа относится к тиольной группе, замещенной алкильной группой, и может быть представлен общей формулой алкилS-.

Термин «амид» в контексте данного документа относится к группе



где R⁹ и R¹⁰ каждый независимо представляет собой водород или гидрокарбильную группу, или R⁹ и R¹⁰, взятые вместе с атомом N, к которому они присоединены, составляют гетероцикл, имеющий от 4 до 8 атомов в кольцевой структуре.

Термины «амин» и «амино» известны в данной области техники и относятся как к незамещенным, так и к замещенным аминам и их солям, например, фрагменту, который может быть представлен



где R⁹, R¹⁰ и R^{10'} каждый независимо представляет собой водород или гидрокарбильную группу, или R⁹ и R¹⁰, взятые вместе с атомом N, к которому они присоединены, составляют гетероцикл, имеющий от 4 до 8 атомов в кольцевой структуре.

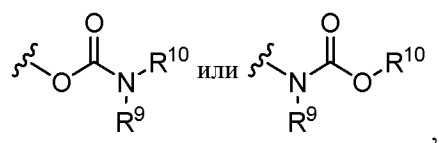
Термин «аминоалкил» в контексте данного документа относится к алкильной группе, замещенной аминогруппой.

Термин «аралкил» в контексте данного документа относится к алкильной группе, замещенной арильной группой.

Термин «арил» в контексте данного документа включает замещенные или

незамещенные ароматические группы с одним кольцом, в которых каждый атом кольца представляет собой углерод. Предпочтительно кольцо представляет собой 5-7-членное кольцо, более предпочтительно 6-членное кольцо. Термин «арил» также включает полициклические кольцевые системы, имеющие два или более циклических кольца, в которых два или более атомов углерода являются общими для двух соседних колец, причем по меньшей мере одно из колец является ароматическим, например, другие циклические кольца могут быть циклоалкилами, циклоалкенилами, циклоалкинилами, арилами, гетероарилами и/или гетероциклами. Арильные группы включают бензол, нафталин, фенантрен, фенол, анилин и т. п.

Термин «карбамат» известен в данной области техники и относится к группе



где R^9 и R^{10} независимо представляют собой водород или гидрокарбильную группу.

Термин «карбоциклилалкил» в контексте данного документа относится к алкильной группе, замещенной карбоциклической группой.

Термин «карбоцикл» включает 5-7-членные моноциклические и 8-12-членные бициклические кольца. Каждое кольцо бициклического карбоцикла может быть выбрано из насыщенных, ненасыщенных и ароматических колец. Карбоцикл включает бициклические молекулы, в которых один, два, три или более атомов являются общими для двух колец. Термин «конденсированный карбоцикл» относится к бициклическому карбоциклу, в котором каждое из колец имеет два общих соседних атома с другим кольцом. Каждое кольцо конденсированного карбоцикла может быть выбрано из насыщенных, ненасыщенных и ароматических колец. В иллюстративном варианте осуществления ароматическое кольцо, например, фенил, может быть конденсировано с насыщенным или ненасыщенным кольцом, например, циклогексаном, цикlopентаном или циклогексеном. Любая комбинация насыщенных, ненасыщенных и ароматических бициклических колец, если позволяет валентность, включена в определение карбоцикла. Типовые «карбоциклы» включают цикlopентан, циклогексан, бицикло[2.2.1]гептан, 1,5-циклооктадиен, 1,2,3,4-тетрагидронафталин, бицикло[4.2.0]окт-3-ен, нафталин и адамантан. Типовые конденсированные карбоциклы включают декалин, нафталин, 1,2,3,4-тетрагидронафталин, бицикло[4.2.0]октан, 4,5,6,7-тетрагидро-1H-инден и бицикло[4.1.0]гепт-3-ен. «Карбоциклы» могут быть замещены в любой одной или более позициях, способных нести атом водорода.

Термин «карбоциклилалкил» в контексте данного документа относится к алкильной группе, замещенной карбоциклической группой.

Термин «карбонат» является признанным в данной области техники и относится к группе $-\text{OCO}_2-$.

Термин «карбокси» в контексте данного документа относится к группе,

представленной формулой $-\text{CO}_2\text{H}$.

Термин «сложный эфир» в контексте данного документа относится к группе $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^9$, где R^9 представляет собой гидрокарбильную группу.

Термин «простой эфир» в контексте данного документа относится к гидрокарбильной группе, связанной через атом кислорода с другой гидрокарбильной группой. Соответственно, эфирный заместитель гидрокарбильной группы может представлять собой гидрокарбил-О-. Эфиры могут быть как симметричными, так и несимметричными. Примеры простых эфиров включают, но не ограничиваются ими, гетероцикл-О-гетероцикл и арил-О-гетероцикл. Простые эфиры включают «алкоксиалкильные» группы, которые могут быть представлены общей формулой алкил-О-алкил.

Термины «гало» и «галоген», используемые здесь, означают галоген и включают хлор, фтор, бром и йод.

Термины «гало» и «галоген», используемые здесь, означают галоген и включают хлор, фтор, бром и йод.

Термины «гетероарил» и «гетарил» включают замещенные или незамещенные ароматические однокольцевые структуры, предпочтительно, 5-7-членные кольца, более предпочтительно, 5-6-членные кольца, причем кольцевые структуры содержат по меньшей мере один гетероатом, предпочтительно от одного до четырех гетероатомов, более предпочтительно один или два гетероатома. Термины «гетероарил» и «гетарил» также включают полициклические кольцевые системы, имеющие два или более циклических кольца, в которых два или более атомов углерода являются общими для двух соседних колец, причем по меньшей мере одно из колец является гетероароматическим, например, другие циклические кольца могут быть циклоалкилами, циклоалкенилами, циклоалкинилами, арилами, гетероарилами и/или гетероциклилами. Гетероарильные группы включают, например, пиррол, фуран, тиофен, имидазол, оксазол, тиазол, пиразол, пиридин, пиразин, пиридазин и пиримидин и т.п.

Термин «гетероатом» в контексте данного документа означает атом любого элемента, отличного от углерода или водорода. Предпочтительными гетероатомами являются азот, кислород и сера.

Предпочтительными гетероатомами являются азот, кислород и сера.

Термины «гетероциклил», «гетероцикл» и «гетероциклический» относятся к замещенным или незамещенным неароматическим кольцевым структурам, предпочтительно 3-10-членным кольцам, более предпочтительно от 3-7-членным кольцам, чьи кольцевые структуры содержат по меньшей мере один гетероатом, предпочтительно от одного до четырех гетероатомов, более предпочтительно один или два гетероатома. Термины «гетероциклил» и «гетероциклический» также включают полициклические кольцевые системы, имеющие два или более циклических кольца, в которых два или более атомов углерода являются общими для двух соседних колец, причем по меньшей мере одно из колец является гетероциклическим, например, другие циклические кольца могут быть

циклоалкилами, циклоалкенилами, циклоалкинилами, арилами, гетероарилами и/или гетероциклилами. Гетероциклические группы включают, например, пиперидин, пиперазин, пирролидин, морфолин, лактоны, лактамы и т.п.

Термин «гидрокарбил» в контексте данного документа относится к группе, которая связана через атом углерода, который не имеет заместителя $=O$ или $=S$, и, как правило, имеет по меньшей мере одну углерод-водородную связь и преимущественно углеродную основную цепь, но может необязательно содержать гетероатомы. Таким образом, группы, такие как метил, этоксиэтил, 2-пиридил и даже трифторметил, считаются гидрокарбильными для целей настоящей заявки, но такие заместители, как ацетил (который имеет заместитель $=O$ на связующем углероде) и этокси (который связан через кислород, а не углерод) нет. Гидрокарбильные группы включают, но не ограничиваются ими, арил, гетероарил, карбоцикл, гетероцикл, алкил, алкенил, алкинил и их комбинации.

Термин «гетероциклилалкил» в контексте данного документа относится к алкильной группе, замещенной гетероциклической группой.

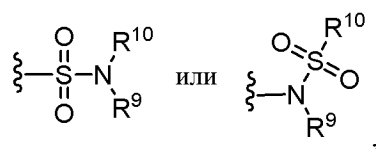
Термин «низший» при использовании в сочетании с химическим фрагментом, таким как ацил, ацилокси, алкил, алкенил, алкинил или алкокси, подразумевает включение групп, где в заместителе имеется десять или меньше атомов, предпочтительно шесть или меньше. Например, «низший алкил» относится к алкильной группе, которая содержит десять или меньше атомов углерода, предпочтительно шесть или меньше. В некоторых вариантах осуществления ацил, ацилокси, алкил, алкенил, алкинил или алкокси заместители, определенные в настоящем документе, представляют собой, соответственно, низший ацил, низший ацилокси, низший алкил, низший алкенил, низший алкинил или низший алкокси, появляются ли они сами по себе или в сочетании с другими заместителями, такие как в перечислениях гидроксиалкил и аралкил (в этом случае, например, атомы в арильной группе не учитываются при подсчете атомов углерода в алкильном заместителе).

Термины «полициклил», «полицикл» и «полициклический» относятся к двум или более кольцам (например, циклоалкилы, циклоалкенилы, циклоалкинилы, арилы, гетероарилы и/или гетероциклилы), в которых два или более атомов являются общими для двух соседних колец, например, кольца представляют собой «конденсированные кольца». Каждое из колец полицикла может быть замещено или незамещено. В некоторых вариантах осуществления каждое кольцо полицикла содержит от 3 до 10 атомов в кольце, предпочтительно от 5 до 7.

Термин «сульфат» известен в данной области техники и относится к группе $-OSO_3H$ или ее фармацевтически приемлемой соли.

Термин «сульфонамид» известен в данной области техники и относится к группе, представленной общими формулами

где R^9 и R^{10} независимо представляют собой водород или гидрокарбил.



Термин «сульфоксид» является общепризнанным в данной области техники и относится к группе -S(O)-.

Термин «сульфонат» известен в данной области техники и относится к группе SO₃H или ее фармацевтически приемлемой соли.

Термин «сульфон» известен в данной области техники и относится к группе -S(O)₂-.

Термин «замещенный» относится к фрагментам, имеющим заместители, заменяющие водород на одном или более атомах углерода основной цепи. Следует понимать, что выражения «замещение» или «замещенный» включают неявное условие, что такое замещение соответствует допустимой валентности замещенного атома и заместителя, и что замещение приводит к образованию стабильного соединения, например, которое самопроизвольно не подвергается трансформации, такой как перегруппировка, циклизация, отщепление и т. д. Предусматривается, что в контексте данного документа термин «замещенный» включает все допустимые заместители органических соединений. В широком аспекте допустимые заместители включают ациклические и циклические, разветвленные и неразветвленные, карбоциклические и гетероциклические, ароматические и неароматические заместители органических соединений. Допустимые заместители могут быть одним или несколькими и одинаковыми или разными для соответствующих органических соединений. Для целей настоящего изобретения гетероатомы, такие как азот, могут иметь водородные заместители и/или любые допустимые заместители органических соединений, описанных здесь, которые удовлетворяют валентности гетероатомов. Заместители могут включать любые заместители, описанные в настоящем документе, например, галоген, гидроксил, карбонил (такой как карбоксил, алкоксикарбонил, формил или ацил), тиокарбонил (такой как тиоэфир, тиацетат или тиоформиат), алкоксил, фосфорил, фосфат, фосфонат, фосфинат, аминок, амидо, амидин, имин, циано, нитро, азидо, сульфгидрил, алкилтио, сульфат, сульфонат, сульфамойл, сульфонамидо, сульфонил, гетероцикл, аралкил или ароматический или гетероароматический фрагмент. Специалистам в данной области техники понятно, что фрагменты, замещенные в углеводородной цепи, сами могут быть замещены, если это целесообразно.

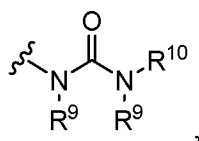
Термин «тиоалкил» в контексте данного документа относится к алкильной группе, замещенной тиольной группой.

Используемый здесь термин «сложный тиоэфир» относится к группе -C(O)SR⁹ или -SC(O)R⁹

где R⁹ представляет собой гидрокарбил.

Термин «сложный тиоэфир» в контексте данного документа эквивалентен простому эфиру, в котором кислород заменен серой.

Термин «мочевина» известен в данной области техники и может быть представлен общей формулой



где R^9 и R^{10} независимо представляют собой водород или гидрокарбил.

Используемый в настоящем документе термин «модулировать» включает в себя ингибирование или подавление функции или активности (такой как пролиферация клеток), а также усиление функции или активности.

Фраза «фармацевтически приемлемый» признана в данной области техники. В определенных вариантах осуществления термин включает композиции, вспомогательные вещества, адъюванты, полимеры и другие материалы и/или лекарственные формы, которые в рамках здравого медицинского заключения подходят для использования в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соразмерных с разумным соотношением пользы/риска.

Термин «фармацевтически приемлемая соль» или «соль» используется в настоящем документе для обозначения соли присоединения кислоты или соли присоединения основания, которая подходит для лечения пациентов или совместима с ним.

Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты» означает любую нетоксичную органическую или неорганическую соль любых основных соединений, представленных формулой I. Иллюстративные неорганические кислоты, которые образуют подходящие соли, включают в себя соляную, бромистоводородную, серную и фосфорную кислоты, а также соли металлов, такие как моногидроортофосфат натрия и гидросульфат калия. Иллюстративные органические кислоты, которые образуют подходящие соли, включают в себя моно-, ди- и трикарбоновые кислоты, такие как гликолевая, молочная, пировиноградная, малоновая, янтарная, глутаровая, фумаровая, яблочная, винная, лимонная, аскорбиновая, малеиновая, бензойная, фенилуксусная, коричная и салициловая кислоты, а также сульфоновые кислоты, такие как п-толуолсульфоновая и метансульфоновая кислоты. Могут быть образованы моно- или дикислотные соли, и такие соли могут существовать в гидратированной, сольватированной или практически безводной форме. Как правило, кислотно-аддитивные соли соединений формулы I более растворимы в воде и различных гидрофильных органических растворителях и обычно демонстрируют более высокие температуры плавления по сравнению с их формами свободного основания. Выбор подходящей соли будет известен специалисту в данной области техники. Другие фармацевтически неприемлемые соли, например, оксалаты, могут быть использованы, например, для выделения соединений формулы I для лабораторного применения или для последующего превращения в фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты.

Термин «фармацевтически приемлемая соль присоединения основания», как он используется в настоящем документе, означает любую нетоксичную соль присоединения органического или неорганического основания любых кислотных соединений, представленных формулой I, или любых их промежуточных соединений. Иллюстративные неорганические основания, которые образуют подходящие соли, включают в себя гидроксид лития, натрия, калия, кальция, магния или бария. Иллюстративные органические основания, которые образуют подходящие соли, включают в себя алифатические, алициклические или ароматические органические амины, такие как метиламин, триметиламин и пиколин или аммиак. Выбор подходящей соли будет известен специалисту в данной области техники.

Многие из соединений, полезных в способах и композициях данного описания, имеют по меньшей мере один стереогенный центр в своей структуре. Этот стереогенный центр может присутствовать в конфигурации R или S, указанные обозначения R и S используются в соответствии с правилами, описанными в Pure Appl. Chem. (1976), 45, 11-30. В описании рассматриваются все стереоизомерные формы, такие как энантиомерные и диастереоизомерные формы соединений, солей, пролекарств или их смесей (включая все возможные смеси стереоизомеров). См., например, WO 01/062726.

Кроме того, некоторые соединения, которые содержат алкенильные группы, могут существовать в виде Z (*zusammen*, вместе) или E (*entgegen*, напротив) изомеров. В каждом случае описание включает как смесь, так и отдельные индивидуальные изомеры.

Некоторые из соединений могут также существовать в таутомерных формах. Такие формы, хотя они явно не указаны в формулах, описанных в настоящем документе, предназначены для включения в объем настоящего описания.

«Пролекарство» или «фармацевтически приемлемое пролекарство» относится к соединению, которое метаболизируется, например, гидролизуется или окисляется, в хозяине после введения с образованием соединения по настоящему изобретению (например, соединений формулы I). Типичные примеры пролекарств включают в себя соединения, которые имеют биологически лабильные или расщепляемые (защитные) группы на функциональном фрагменте активного соединения. Пролекарства включают в себя соединения, которые можно окислять, восстанавливать, аминировать, дезаминировать, гидроксिलировать, дегидроксिलировать, гидролизовать, дегидролизовать, алкилировать, дезалкилировать, ацилировать, дезацилировать, фосфорилировать или дефосфорилировать для получения активного соединения. Примеры пролекарств, использующих сложный эфир или фосфорамидат в качестве биологически лабильных или расщепляемых (защитных) групп, раскрыты в патентах США 6,875,751, 7,585,851 и 7,964,580, описания которых включены в настоящий документ посредством ссылки. Пролекарства настоящего изобретения метаболизируются с образованием соединения формулы I. Настоящее описание включает в свой объем пролекарства соединений, описанных в настоящем документе. Обычные процедуры выбора и приготовления подходящих пролекарств описаны, например, в “Design of Prodrugs” Ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985.

Фраза «фармацевтически приемлемый носитель» при использовании в настоящем документе означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый фильтр, разбавитель, вспомогательное вещество, растворитель или инкапсулирующий материал, пригодный для приготовления лекарственного средства для медицинского или терапевтического применения.

Используемые здесь термины «Log растворимости», «LogS» или «logS» используются в данной области для количественного определения растворимости соединения в воде. Растворимость соединения в воде значительно влияет на его характеристики всасывания и распределения. Низкая растворимость часто сопровождается плохой абсорбцией. Значение LogS представляет собой логарифм с отделенной единицей (основание 10) растворимости, измеренной в моль/литр.

Примеры

Теперь изобретение, в целом описываемое, будет более легко понято со ссылкой на следующие примеры, которые включены только в целях иллюстрации определенных аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения изобретения.

Способы

Репортерные клеточные линии

Репортерную клеточную линию C2C12 саркоспана человека EGFP (hSSPN-EGFP) использовали, как описано Shu et al., Skelet Muscle. 2019; 9(1):32. Используя идентичный подход, была создана клеточная линия C2C12 саркоспанлюциферазы человека (hSSPN-luc), которая использовалась при вторичном скрининге.

Малые молекулы

Скрининговые библиотеки были предоставлены Molecular Screen Shared Resource в Калифорнийском университете в Лос-Анджелесе. Коммерчески доступные соединения, используемые в последующих исследованиях, были приобретены у Asinex и Life Chemicals Inc.

Высокопроизводительный скрининг

Высокопроизводительные скрининговые миобласты hSSPN-EGFP высевали при 500 клеток на лунку в 50 мкл среды для выращивания в 384-луночных черных микропланшетах (Greiner) с прозрачным дном с использованием Multidrop 384 (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 3 дней, чтобы позволить клеткам достичь конфлюэнтности. По достижении конфлюэнтности среду для выращивания заменяли 50 мкл дифференцировочной среды, состоящей из DMEM, с 2% лошадиной сывороткой (Sigma-Aldrich) с использованием EL406 комбинированного моющего дозатора (Biotek). На 2-й день дифференцировки среду на клетках отсасывали, оставляли с остаточным объемом 10 мкл и заменяли 30 мкл свежей среды для дифференцировки. 0,5 мкл малых молекул в ДМСО или только ДМСО (для лунок с носителем и положительным контролем) добавляли в каждую лунку, используя Biomek Fx (Beckman). Для обеспечения надлежащего смешивания ДМСО во все лунки добавляли 50 мкл дополнительной дифференцировочной

среды, за исключением обработанных с положительным контролем лунок, которые вместо этого получали 50 мкл среды, содержащей инсулин-трансферрин селен (ITS) (Gibco), до конечной концентрации 1% ITS. Конечная концентрация соединения в каждой обработанной лунке составляла 5,5 мкМ в 0,55% ДМСО и 0,55% ДМСО только в лунках, обработанных носителем и положительным контролем. После 48 часов инкубации среду заменяли флюоробритом DMEM (Gibco) и каждый планшет изображали с использованием системы визуализации высокого содержания ImageXpress Micro Confocal (Molecular Devices). Интенсивность флуоресценции изображенных клеток определяли с использованием пользовательского модульного анализа в программном обеспечении MetaXpress Analysis (Molecular Devices). Параметры анализа были следующими: верхний слой (размер: 12, форма фильтра: круг), адаптивный порог (источник: верхний слой, минимальная ширина: 10, максимальная ширина: 800, интенсивность над локальным фоном: 500), фильтрующая маска (тип фильтра: фильтр минимальной площади, минимальное значение: 500).

Анализ люциферазы

Миобласты hSSPN-люциферазы культивировали, как описано выше. После 48 часов обработки планшета давали уравновеситься до комнатной температуры. Среду для культивирования клеток в каждой лунке отсасывали с использованием комбинированного промывочного дозатора EL406. Реагент системы анализа люциферазы Bright-Glo (Promega) и среду для дифференцировки добавляли к клеткам в разведении 1:2 с использованием Multidrop 384. После 3-минутной инкубации при комнатной температуре сигнал люминесценции количественно определяли с использованием планшет-ридера Envision (PerkinElmer). Относительные единицы люминесценции анализировали для определения кратности изменения клеток, обработанных по сравнению с клетками, обработанными носителем.

Культура клеток

Клетки C2C12 (Американская коллекция типовых культур) выращивали при 37°C с 5% CO₂ в среде для выращивания, содержащей DMEM (Gibco) с 20% FBS (Sigma-Aldrich). При достижении 90-100% конfluence миобласты индуцировали к дифференцировке путем замены среды на среду для дифференцировки, состоящую из DMEM с 2% лошадиной сывороткой (Sigma-Aldrich). Условно immortalized миобласты H2K WT и *mdx* с nonsense-мутацией в экзоне 23 дистрофина были подарком Теренса Партриджа, доктора философии (Детский национальный медицинский центр, Вашингтон, округ Колумбия). См. Morgan et al., Dev Biol. 1994;162(2):486-98. Миобластам давали возможность пролиферировать на планшетах, покрытых 0,01% желатином (Sigma-Aldrich), при 33°C с 5% CO₂ в среде для выращивания, содержащей DMEM, 20% HI-FBS (Invitrogen), 2% L-глутамин (Sigma-Aldrich), 2% экстракт куриного эмбриона (Accurate Chemical), 1% пенициллин-стрептомицин (Sigma-Aldrich) и 20 ед./мл свежего гамма-интерферона (Gibco). Для дифференцировки миобласты H2K высевали на чашки, покрытые матригелем 0,1 мг/мл (Corning), разведенным в DMEM, и выращивали в условиях пролиферации. При

достижении 90-100% конфлюентности клетки выращивали при 37°C с 5% CO₂ в среде для дифференцировки, содержащей DMEM с 5% лошадиной сывороткой (Sigma-Aldrich), 2% L-глутамина и 1% пенициллином-стрептомицином по установленным протоколам.

Анализ экспрессии генов

РНК из мышечных трубочек, обработанных в течение 48 часов, экстрагировали из клеток с использованием фазового разделения на основе тризола (Thermo Fisher Scientific), Chomczynski et al., *Biotechniques*. 1993;15(3):532-4, 6-7. Концентрации РНК определяли с использованием NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific), и 750 нг РНК в реакционной смеси объемом 20 мкл подвергали обратной транскрипции с использованием синтеза кДНК iScript (Bio-Rad) при следующих условиях циклирования: 25°C в течение 5 минут, 42°C в течение 30 минут, 85°C в течение 5 мин. Для количественной ПЦР на мышцах использовали SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad), по 400 нМ каждого оптимизированного прямого и обратного праймера (SSPN F: 5' TGCTAGTCAGAGATACTCCGTTC 3', SSPN R: 5' GTCCTCTCGTCAACTTGGTATG 3', BACT F: 5' GAGCACCTGTGCTGCTCACCG 3', BACT R: 5' CAATGCCTGTGGTACGACCA 3') и кДНК, соответствующую 37,5 нг РНК, использовали для амплификации кДНК, измеренной с помощью системы ПЦР в реальном времени QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific) при следующих условиях реакции: 55°C в течение 2 минут, 95°C в течение 2 минут, 40 циклов 95°C в течение 10 секунд и 62°C в течение 30 секунд и стадия диссоциации. Для количественной ПЦР образцов человека использовались анализы TaqMan для количественного определения SSPN (идентификатор анализа Hs01025520m_1) и АСТВ (идентификатор анализа Hs01060665_g1) со следующими условиями реакции: 50°C в течение 2 минут, 95°C в течение 10 минут, 40 циклов 95°C в течение 15 секунд и 62°C в течение 1 минуты. Каждый образец запускали в трехкратной повторности. Данные анализировали с использованием метода ddCT и нормализовали по эталонному гену АСТВ с образцами, обработанными носителем, в качестве калибратора (относительная экспрессия контроля носителя=1).

Иммуноблоттинг

Мышечные трубочки, обработанные в течение 48 часов, лизировали с использованием буфера RIPA (Thermo Fisher Scientific), содержащего коктейль ингибиторов протеазы Halt (Thermo Fisher Scientific). Лизаты клеток в буфере RIPA встряхивали в течение 1 часа при 4°C и центрифугировали при 1000 об./мин. в течение 30 минут при 4°C. Надосадочную жидкость собирали, определяли концентрацию белка с помощью анализа белка DC (Bio-Rad) и нормализовали до 2 мг/мл в воде и буфере для образцов Лэмли с конечной концентрацией глицерина 10% (Sigma-Aldrich), 5% бета-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich), 3% додецилсульфата натрия (Sigma-Aldrich) и 0,05% бромфенолового синего (Sigma-Aldrich). Для SDS-PAGE образцы нагревали до 95°C в течение 2 минут перед загрузкой 40 мкг на 4-12% трис-глицин или бис-трис-полиакриламидные гели (Novex), подвергали электрофорезу в течение 2 часов при 100 вольтах при к. т. и переносили на нитроцеллюлозную мембрану в течение 2 часов при 100 вольтах при 4°C. Окрашивание пунцовым цветом S выполняли, чтобы визуализировать

загрузку белка и подтвердить перенос белка. Мембраны блокировали 5% обезжиренным сухим молоком в трис-буферном солевом растворе с pH 7,4 с 0,1% tween-20 (Sigma-Aldrich) (TBST) в течение 1 часа при комнатной температуре и инкубировали в шейкере в течение ночи при 4°C со следующими первичными антителами, разведенными в блокирующем буфере, содержащем 5% обезжиренного сухого молока (гвоздика), если не указано иное: SSPN (sc-393187, Santa Cruz Biotechnology, 1:200), гликозилированный альфа-дистрогликан (ИН6 C4, Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:100 в 1% молоке, основной альфа-дистрогликан (Beadle Lab, 1:1000 в 1% молоке), UTRN (MANCHO3, Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:100) и GAPDH (Mab374, Millipore, 1:10000). После трех 10-минутных промывок TBST мембраны инкубировали в антителе козы к IgG-HRP мыши (ab6789, Abcam, 1:5000 для всех, 1:10000 для GAPDH в 5% молоке) или в антителе козы к IgG-HRP кролика (ab6721, Abcam, 1:10 000 в 1% молоке) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем каждую мембрану промывали три раза в течение 10 мин. с помощью TBST, инкубировали в хемилюминесцентном субстрате SuperSignal West Pico (Thermo Fisher Scientific) в течение 5 мин. при к. и. на орбитальном шейкере и подвергали воздействию автордиографических пленок (Agfa). Автордиографические пленки были разработаны с использованием настольного процессора SRX-101A (Konica Minolta), отсканированы в цифровой файл и проанализированы с помощью денситометрии полос с использованием ImageJ версии 1.51. Полосы целевого белка нормализовали для загрузки контрольного GAPDH обработанными носителем клетками, служащими образцом калибратора (относительные уровни белка контроля носителя=1).

Анализ C2C12 SSPN-HiBiT в формате 12-луночного планшета

Миобласты C2C12 SSPN-HiBiT высевали по 25000 клеток на лунку в 2 мл среды для выращивания в 12-луночные планшеты и инкубировали в течение 3 дней. По достижении конфлюентности среду для выращивания заменяли 2 мл среды для дифференцировки. На 2-й день дифференцировки среду на клетках заменяли 2 мл среды для дифференцировки, содержащей соединения в конечной концентрации 5,5 мкМ в 0,06% ДМСО. Для контрольных клеток, обработанных носителем, к клеткам добавляли 0,06% ДМСО. Через 48 часов клетки промывали PBS и замораживали на 2-24 часа. Планшеты, содержащие клетки, оттаивали на льду и в каждую лунку добавляли 100 мкл охлажденного льдом модифицированного буфера RIPA, содержащего 1% Triton X-100, 0,05% DOC, 0,05% SDS и ингибитор протеазы Halt. Клетки соскребали, переносили в пробирки на 1,5 мл и центрифугировали в течение 20 мин. при 16000 g при 4°C. Лизаты клеток переносили в новые пробирки. Анализ DC проводили на клеточных лизатах для определения концентрации белка. 384-луночные микропланшеты с белыми стенками и белым дном (Greiner) предварительно заполняли 15 мкл PBS и в каждую лунку добавляли по 15 мкл клеточных лизатов в трех повторностях. Затем в каждую лунку добавляли по 30 мкл рабочего раствора Nano-Glo HiBiT Lytic Detection и инкубировали в течение 30 мин. при комнатной температуре при встряхивании. Люминесценцию измеряли на планшет-ридере EnVision, и сигнал нормализовали по концентрации белка и сигналу от контролей,

обработанных носителем.

Анализ C2C12 SSPN-HiBiT в формате 384-луночных микропланшетов

Миобласты C2C12 SSPN-HiBiT высевали по 500 клеток на лунку в 50 мкл среды для выращивания в 384-луночные белые микропланшеты с прозрачным дном (Greiner) и инкубировали в течение 3 дней. По достижении конфлюентности среду для выращивания заменяли 50 мкл среды для дифференцировки, состоящей из DMEM, не содержащей фенолового красного, с 2% лошадиной сыворотки (Sigma-Aldrich) с использованием комбинированного промывочного дозатора EL406 (Biotek). На 2-й день дифференцировки среду на клетках отсасывали, оставляли с остаточным объемом 10 мкл и заменяли 30 мкл свежей среды для дифференцировки. 0,5 мкл малых молекул в ДМСО или только ДМСО (для лунок с носителем и положительным контролем) добавляли в каждую лунку, используя Biomek Fx (Beckman). Для обеспечения надлежащего перемешивания ДМСО во все лунки, кроме лунок, обработанных положительным контролем, добавляли 50 мкл дополнительной среды для дифференцировки. Конечная концентрация соединения в каждой обработанной лунке составляла 0,5-10 мкМ в 0,55% ДМСО и 0,55% ДМСО только для носителя. После 48 часов инкубации планшет промывали DMEM, не содержащей фенолового красного, отсасывали и оставляли с остаточным объемом 5 мкл, используя комбинированный промывочный дозатор EL406. После промывки добавляли 25 мкл среды для дифференцировки, содержащей 12 мкМ ядерного красителя DRAQ5, до достижения конечной концентрации 10 мкМ в каждой лунке и инкубировали в течение 15 мин. при 37°C с 5% CO₂. Клетки визуализировали с использованием системы визуализации изображений высокого содержания ImageXpress Micro Confocal (Molecular Devices). Количество ядер визуализированных клеток определяли с помощью специального модуля анализа в программном обеспечении MetaXpress Analysis (Molecular Devices). После визуализации и анализа планшет отсасывали, оставляли с остаточным объемом 5 мкл и помещали при -80°C на 2-24 часа. Планшет оттаивали при комнатной температуре и добавляли 25 мкл PBS, а затем 30 мкл рабочего раствора Nano-Glo HiBiT Lytic Detection, приготовленного в соответствии с рекомендациями производителя. Люминесценцию измеряли с помощью планшет-ридера EnVision, и сигнал каждой лунки нормализовали по количеству ядер и сигналу от контролей, обработанных носителем.

Анализ белков клеточной поверхности

После 48 часов обработки мышечные трубочки трижды промывали ледяным PBS, содержащим 0,1 г/л как CaCl₂ (0,9 мМ), так и MgCl₂ (1,05 мМ) (Corning), и инкубировали в 0,5 мг/мл EZ-Link Sulfo-NHS-SS-биотине (Thermo Fisher Scientific) при 4°C с легким вращением в течение 30 минут для мечения белков клеточной поверхности. Все этапы выполняли при 4°C, если не указано иное. Клетки трижды промывали ледяным 100 мМ глицином в PBS в течение 5 минут при осторожном вращении для удаления непрореагировавшего биотина. После промывки PBS клетки лизировали в буфере для солибилизации, состоящем из 50 мМ Tris-HCl с pH 7,8, 500 мМ NaCl, 1% дигитонина (Biosynth) и ингибиторов Halt протеазы и фосфатазы. Образцы вращали при 4°C в течение

10 мин. и центрифугировали при 4°C при 14000 об./мин. в течение 20 мин. для образования осадка. Анализ DC (Bio-Rad) использовали для определения концентрации белка в супернатанте (общий лизат). Гранулы высокоэффективного нейтравидина агарозы (Thermo Fisher Scientific) промывали буфером для солюбилизации перед объединением с равными концентрациями общего лизата и инкубировали при 4°C в течение ночи с вращением. Гранулы центрифугировали при 4°C при 2500 об./мин. в течение 5 мин. и промывали солюбилизирующим буфером, содержащим 0,1% дигитонина. Это повторяли в общей сложности для 4 промывок. Биотинилированные белки клеточной поверхности отщепляли от биотин-авидина с использованием 2 х буфера для образцов Лэмли (LSB) с 50 мМ DTT, вращали при комнатной температуре в течение 60 минут и нагревали при 95°C в течение 5 минут. Образцы центрифугировали при 2500 об./мин. при 4°C в течение 5 мин. и собирали надосадочную жидкость (мембранную фракцию) для иммуноблоттинга.

Анализ стабильности мембран

Анализ стабильности мембраны был модифицирован по сравнению с ранее описанными методами [32]. Растворы для осмотического шока готовили из основного раствора, содержащего 5 мМ HEPES, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 5 мМ NaCl, 1,2 мМ CaCl₂ и 1 мМ глюкозы. К базовым растворам добавляли сахарозу до осмолярности 50, 80, 100, 280 и 300 мосмоль. Фактическую осмолярность определяли с использованием осмометра давления паров VAPRO (Wescor Inc.). Мышечные трубочки обрабатывали в течение 48 часов и на 4-й день дифференцировки подвергали 20-минутному осмотическому шоку при 37°C с использованием растворов от 28,5 до 223,5 миллиосмолей (мосмоль). Надосадочную жидкость собирали и центрифугировали для отделения клеточного дебриса. Адгезивные клетки трипсинизировали и осаждали перед лизисом водой и 3 циклами замораживания-оттаивания. Анализ креатинкиназы (Sekisui Diagnostics) использовали для измерения уровней креатинкиназы (СК) в надосадочной и лизатной фракциях. В 96-луночный планшет загружали по 4 мкл каждого образца и 140 мкл реагента на лунку в трех экземплярах. U/L СК рассчитывали следующим образом (mOD/мин.) (общий объем в мл) (коэффициент разбавления) / (6.22M-1cm-1) (световой путь в см) (объем образца в мл). Процент высвобождения СК рассчитывали следующим образом: $СК_{\text{внешнеклеточная}} / (СК_{\text{внешнеклеточная}} + СК_{\text{внутриклеточная}}) * 100$.

миРНК-опосредованный нокдаун

Транфекционный реагент Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) использовали для трансфекции мышечных трубочек H2K *mdx* 24 или 48 нМ миРНК SSPN Silencer Select (siRNA ID s68932, Life Technologies) или флуоресцентный универсальный отрицательный контроль миРНК MISSION №1, цианин 3 (Sigma Aldrich), разбавленный в среде с уменьшенной сывороткой Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific). Реагент для трансфекции и разбавленную миРНК добавляли к 1 мл среды для выращивания на лунку в 24-луночном планшете для культивирования клеток.

Индекс слияния мышечных трубочек

Миобласты в 96-луночном планшете обрабатывали в течение 72 часов, начиная со

2-го дня дифференцировки, фиксировали 4% параформальдегидом в течение 20 минут, пермеабилizировали 0,2% Triton X-100 (Sigma) в течение 10 минут и блокировали 1% BSA в течение 30 мин. Тяжелую цепь миозина (МНС) определяли с использованием 10 мкг/мл MF-20 (Банк исследований гибридом развития) в 1% BSA в течение ночи и 10 мкг/мл антитела козы к иммуноглобулинам мыши Alexa Fluor Plus 594 (Thermo Fisher Scientific) в 1% BSA в течение 1 часа. Промывки PBS выполняли между каждым вышеописанным этапом. Ядра окрашивали 5 мкг/мл Hoechst (Thermo Fisher Scientific) в течение 20 минут перед визуализацией. Каждую обработку проводили в трех лунках, и на каждую лунку захватывали три поля. ImageJ использовали для подсчета общего количества ядер и ядер в МНС-положительной клетке. Индекс слияния рассчитывали как количество ядер в МНС-положительной клетке/общее количество ядер.

Анализ периода полувыведения

Анализ периода полувыведения был выполнен Eurofins Panlabs Inc. с использованием 1 мкМ соединения с конечной концентрацией ДМСО 0,5%. PBS или плазму крови мышей CD-1 предварительно нагревали до 37°C в течение 5 минут перед добавлением тестируемых соединений и продолжали инкубацию при 37°C. На 0, 30, 60, 120, 240 и 1440 мин. аликвоту раствора, содержащего соединения, смешивали с ацетонитрилом/метанолом, перемешивали и центрифугировали. Надосадочные жидкости использовали для анализа ВЭЖХ-МС/МС.

Обработка in vivo

Для предварительной оценки безопасности ОТ-9 мы провели внутрибрюшинные инъекции 6-месячным самцам линии C57/Bl6. Мышам вводили 100 мкл носителя (5% ДМСО (Sigma), 95% PBS), 100 мкл 30 мг/кг ОТ-9 в носителе или 100 мкл 50 мг/кг ОТ-9 в носителе. (n=1 мышь на обработку). За мышами наблюдали в течение 72 часов, затем умерщвляли для визуальной оценки места инъекции и внутренних органов (данные не показаны). Для оценки активности однопаметным самцам *mdx* в возрасте 20 недель вводили в обе передние большеберцовые мышцы носитель (5% ДМСО, 95% PBS) или 86 мкг ОТ-9. Двум мышам вводили в обе ТА носитель, а трем мышам вводили в обе ТА по 20 мкл ОТ-9 (9,4 мМ раствор, содержащий 86 мкг ОТ-9). Через 4 часа мышцы собирали и обрабатывали для анализа экспрессии генов. Для оценки активности ОТ-9m после местного введения самцам *mdx* в возрасте 19-22 недель вводили в обе передние большеберцовые мышцы носитель (5% ДМСО, 95% PBS) или 3 мг/кг и 10 мг/кг ОТ-9m. Через 4 часа мышцы собирали и обрабатывали для анализа экспрессии генов. Для оценки активности ОТ-9m после системного введения 13-недельным самцам *mdx* подкожно вводили носитель (4% ПЭГ-200 в гидроксипропил-β-циклодекстрине) или 20 мг/кг/день ОТ-9m. После 13 дней обработки мышцы собирали и обрабатывали для анализа экспрессии генов.

Анализ данных

Надежная строго стандартизированная разность средних (SSMD*) использовалась для оценки качества планшета и выбора попаданий. $SSMD^* = X_P - X_N / 1,4826 \sqrt{s_P^2 + s_N^2}$, где X_P , X_N , S_P и S_N медианы и медианные абсолютные отклонения положительных и

отрицательных контролей соответственно.[33] Для качества планшетов $SSMD^* \geq 1$ указывает на умеренный положительный контроль хорошего качества. Для начального выбора попаданий попаданием считалось 1,4-кратное увеличение по сравнению с носителем и $SSMD^* > 0,25$. Статистический анализ был выполнен с использованием Prism версии 7.0 (программное обеспечение GraphPad) для Mac OS X с использованием двустороннего непараметрического критерия Колмогорова-Смирнова. Данные представлены как среднее+SEM. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Полученные результаты

Ранее мы создали и утвердили высокопроизводительный анализ на основе мышечных клеток для выявления низкомолекулярных энхансеров экспрессии гена SSPN человека. Shu et al., *Skelet Muscle*. 2019;9(1):32. Используя анализ, мы провели скрининг клинических соединений и продемонстрировали, что анализ способен идентифицировать малые молекулы, которые увеличивают экспрессию гена SSPN и белка как в мышечных трубочках дикого типа, так и в мышечных трубочках с дефицитом дистрофина. Id. В этом текущем исследовании мы просмотрели большие химические библиотеки с целью выявления соединений, которые могут быть превращены в новые энхансеры химического состава SSPN. Рекомендованные библиотеки были разработаны для максимального сходства с лекарствами на основе правила 5 Липински, которое определяет параметры, которые можно использовать для прогнозирования оптимальной пероральной биодоступности у людей.

Высокопроизводительный скрининг 200 000 малых молекул

Был проведен высокопроизводительный скрининг более 200 000 малых молекул из рекомендованных библиотек с использованием клеточного анализа экспрессии гена SSPN человека. Репортерные клетки, использованные в анализе, представляли собой мышечные миобласты C2C12, стабильно трансфицированные конструкцией, содержащей промоторную область SSPN человека, за которой следует кодирующая последовательность усиленного зеленого флуоресцентного белка (hSSPN-EGFP). Используя анализ hSSPN-EGFP, мы провели скрининг соединений в концентрации 5,5 мкМ ($n=1$) (фиг. 1a). Качество планшета рассчитывали с использованием надежной строго стандартизированной средней разности ($SSMD^*$) (фиг. 7). Чтобы исключить специфичные для анализа ложноположительные результаты, мы провели обратный скрининг, используя стабильно трансфицированную линию репортерных клеток, содержащую репортер люциферазы для активности промотора SSPN человека (hSSPN-luc). Первые 1000 попаданий были повторно проверены в мышечных трубочках репортера промотора hSSPN-EGFP ($n=3$) и hSSPN-люциферазы ($n=3$). Из 1000 попаданий 63 соединения увеличивали экспрессию репортера в обеих линиях репортерных клеток и поэтому считались подтвержденными попаданиями. Подтвержденные попадания были разбиты на три группы, основанные на общих структурных особенностях: фармакофор 1, фармакофор 2 и другая категория, которая не

имела объединяющих структурных особенностей. Соединения фармакофора 2 состояли из плоских многокольцевых структур, которые, как известно, включаются в ДНК, что считалось ответственностью. Поэтому мы сосредоточились на фармакофоре 1 и других классах соединений.

Выбор «попадание-отведение» с использованием мышинных мышечных клеток с дефицитом дистрофина

Для начального выбора от попадания к отведению все имеющиеся в продаже подтвержденные попадания тестировали в концентрации 5,5 мкМ в мышечных трубочках *mdx* с дефицитом дистрофина, чтобы определить, были ли соединения активны в соответствующей модели заболевания. В группе фармакофора 1 девять из шестнадцати попаданий увеличивали экспрессию гена SSPN в 1,1-1,8 раза по сравнению с контрольным носителем (фиг. 1b). В другой группе восемь из двадцати трех других попаданий увеличивали экспрессию гена SSPN в 1,2-2,0 раза (фиг. 1c). Первоначальный выбор «попадание-отведение» продемонстрировал, что последовательный скрининг с двумя отдельными линиями репортерных клеток позволяет идентифицировать соединения, которые повышают уровни мРНК SSPN как в мышинных мышечных клетках дикого типа, так и в мышинных клетках с дефицитом дистрофина.

После исключения соединений, которые были нестабильны в растворе или давали сильно различающиеся результаты, осталось девять соединений. Эти девять соединений были протестированы в шести различных концентрациях в диапазоне от 0,5 до 50 мкМ в мышечных трубочках *mdx* для определения активности в широком диапазоне концентраций. Все соединения, кроме PC1-41, проявляли активность по меньшей мере в одной концентрации (фиг. 2a). PC1-36, PC1-42 и ОТ-9 индуцировали ответ, зависящий от концентрации, с пиком при 5,5 мкМ. Чтобы определить, было ли увеличение мРНК SSPN также очевидным на уровне белка, мы обработали мышечные трубочки *mdx* от 2,5 до 10 мкМ ОТ-9, PC1-36 и PC1-42 и проанализировали лизаты общего белка с помощью иммуноблоттинга с антителами к SSPN. Мы обнаружили, что PC1-42 не вызывает увеличения белка SSPN (данные не показаны). Соединения по изобретению ОТ-9 и PC1-36 увеличивали уровни белка SSPN в мышечных трубочках *mdx* в 1,5 раза, демонстрируя, что эти соединения увеличивали как ген SSPN, так и содержание белка в мышечных клетках с дефицитом дистрофина (фиг. 2b-c).

Ранее мы профилировали экспрессию гена SSPN в дифференцирующихся мышечных трубочках и обнаружили, что мРНК SSPN начинает увеличиваться на третий день и достигает 10-кратного повышения уровня на пятый день дифференцировки, указывая на то, что уровни SSPN увеличиваются по мере дифференцировки клеток [26]. Чтобы определить, было ли вызванное соединением увеличение экспрессии SSPN следствием усиленной дифференцировки, мы обработали мышечные трубочки *mdx* ОТ-9 и оценили индекс слияния и экспрессию миогенного транскрипционного фактора MYOG, маркеров дифференцировки. ОТ-9 индуцирует небольшое увеличение индекса слияния и экспрессии гена MYOG в мышечных трубочках *mdx*, указывая на то, что увеличение SSPN

может увеличивать скорость дифференцировки или что OT-9 может частично работать через пути дифференцировки (фиг. 8).

Чтобы подтвердить, что подтвержденные попадания не действовали только на дистрофические клеточные линии специфичным для клеточной линии образом, мы протестировали OT-9 и PC1-36 в мышечных трубочках C2C12 дикого типа. Мы обнаружили, что оба соединения повышают уровень мРНК SSPN в мышечных трубочках C2C12. (Фиг. 3). Обработка мышечных миобластов C2C12, H2K WT и H2K *mdx* показала, что OT-9, а не PC1-36, увеличивает уровни мРНК SSPN во всех линиях миобластов. Уникальная способность OT-9 увеличивать SSPN в миоблестах предполагает, что OT-9 и PC1-36 могут иметь разные биологические мишени (фиг. 9).

Для эффективного тестирования новых аналогов мы создали метод обнаружения белка SSPN в клетках, например, SSPN-HiBiT. SSPN-HiBiT основан на мышечной клеточной линии C2C12, экспрессирующей эндогенный белок SSPN с белком слияния с N-концом, называемым HiBiT, 11-аминокислотной субъединицей фермента люциферазы (фиг. 10a). Белок SSPN-HiBiT количественно определяют путем добавления субстрата и более крупной субъединицы фермента люциферазы для катализа образования люминесцентного сигнала. Клетки C2C12 SSPN-HiBiT экспрессируют репортерный белок на возрастающих уровнях в ходе дифференцировки, что подтверждается нашим предыдущим открытием, что мРНК SSPN увеличивается с дифференцировкой (фиг. 10b). Мы идентифицировали GW5074, ингибитор c-raf, для использования в качестве положительного контроля для анализа. Мышечные трубочки SSPN-HiBiT C2C12, обработанные 5 мкМ GW5074, демонстрируют 1,35-кратное увеличение уровней SSPN-HiBiT (фиг. 10c). Чтобы подтвердить способность репортера обнаруживать изменения в уровнях белка SSPN после обработки нашими ведущими соединениями, мы обрабатывали клетки SSPN-HiBiT в форматах 12-луночных и 384-луночных планшетов 0,5-10 мкМ OT-9. Анализы выявили дозозависимое увеличение SSPN (фиг. 10d). Эти результаты демонстрируют, что анализы SSPN-HiBiT C2C12 являются полезными инструментами в анализе SAR наших ведущих соединений.

Соединение OT-9 увеличивает адгезионные комплексы, связывающие ламинин, на поверхности клеток

В поперечнополосатых мышцах SSPN является каркасом для трех основных ламинин-связывающих адгезивных комплексов, которые соединяют клеточную мембрану (сарколемму) с внеклеточным матриксом: DGC, UGC и $\alpha\beta$ 1D-интегрин. Сверхэкспрессия SSPN в мышцах *mdx* увеличивает локализацию UGC и комплекса $\alpha\beta$ 1D-интегрин. Чтобы определить, влияет ли OT-9 на локализацию SSPN на клеточной мембране в мышечных трубочках, мы пометили белки клеточной поверхности биотином, вступающим в реакцию с амином. Мышечные трубочки C2C12, обработанные OT-9, инкубировали в непроницаемом для клеток биотине, лизировали для солюбилизации белков, аффинно очищали авидином и элюировали LSB для получения белков клеточной поверхности. Используя антитела, которые распознают ламинин-связывающий гликоэпитоп α -DG

(гликан) и коровый белок α -DG (фиг. 4а), мы провели иммуноблот-анализ биотинилированных белков клеточной поверхности и общего лизата. ОТ-9 увеличивал гликозилированный α -DG в 1,8 раза и коровый α -DG в 1,6 раза на поверхности клетки (фиг. 4b-d). Иммуноблот-анализ лизатов общего белка показал, что ОТ-9 не увеличивал уровни гликозилированного α -DG, но увеличивал коровый α -DG в 1,5 раза (фиг. 11). Разница в уровнях гликозилированного α -DG на клеточной поверхности и в общем лизате предполагает, что ОТ-9 увеличивает мембранную локализацию ламинин-связывающего α -DG.

У мышей *mdx* со сверхэкспрессией SSPN паралог дистрофина атрофин активируется в сарколемме и способствует увеличению адгезии мембраны к ЕСМ. Используя тот же экспериментальный подход к биотинилированию, мы оценили, влияет ли ОТ-9 на экспрессию атрофина на мембране клеточной поверхности. В то время как атрофин является внутриклеточным и, следовательно, не биотинилируется напрямую, солюбилизирующий буфер содержал мягкий детергент, который сохранял взаимодействия внутри адгезивных комплексов, включая взаимодействия атрофина, β -дистрогликана, и мышечные трубочки клеточной поверхности α -DG. *mdx*, обработанные ОТ-9, проявляли 1,6-кратное увеличение мембранно-ассоциированного белка атрофина (фиг. 4e-f). Взятые вместе, наши результаты демонстрируют, что ОТ-9 увеличивал локализацию сарколеммы как α -DG, так и атрофина, что указывает на активацию ламинин-связывающего атрофинового гликопротеинового комплекса.

ОТ-9 улучшает стабильность мембран в мышечных трубочках с дефицитом дистрофина за счет усиления саркоспана.

Чтобы определить, привело ли увеличение атрофина и дистрогликана в клеточной мембране к функциональному улучшению стабильности мембраны, мы использовали модифицированный протокол для анализа высвобождения креатинкиназы (СК) *in vitro* [32]. Анализ влечет за собой осмотический шок мышечных трубочек, который вызывает набухание клеток и повреждение мембран, что позволяет высвобождать внутриклеточные СК из клетки в окружающую среду (фиг. 5а). Чтобы определить оптимальные условия для осмотического шока, которые приводят к обнаруживаемым изменениям в высвобождении СК, мы обрабатывали *mdx* носителем или 5 мкМ ОТ-9 в течение 48 часов, а затем индуцировали осмотический шок, используя растворы в диапазоне от 28,5 до 223,5 миллиосмолей (мОсмол), с 223,5 мОсмол ближе всего к физиологической осмолярности (280 мОсмол). Мышечные трубочки *mdx* демонстрировали более высокий выброс СК с более низкими, более повреждающими концентрациями осмолярности (фиг. 5b). Осмотический шок с раствором 28,5 мОсмол приводил к высвобождению СК на 30-40%, в то время как раствор с концентрацией 45 и 63 мОсмол вызывал высвобождение СК на 10-15%, что указывает на относительно меньшее повреждение мембраны. В клетках, подвергшихся осмотическому шоку растворами с концентрацией 45, 63 и 223,5 мОсмол, ОТ-9 значительно снижал высвобождение СК, что свидетельствует о том, что ОТ-9 стабилизировал мембрану и защищал ее от повреждения, вызванного осмотическим шоком.

Обработка ОТ-9 не снижала высвобождение СК в клетках, подвергшихся осмотическому шоку растворами с концентрацией 28,5 мОсмол, что указывает на то, что ОТ-9 не был способен стабилизировать мембрану, вероятно, из-за серьезного повреждения мембраны, вызванного чрезвычайно низкой осмолярностью.

Чтобы определить, зависит ли мембраностабилизирующий эффект, индуцированный ОТ-9, от SSPN, мы провели миПНК-опосредованный нокдаун SSPN параллельно с обработкой соединением. Чтобы оценить эффективность нокдауна, мы сначала обработали мышечные трубочки *mdx* 1, 5 или 10 мкМ ОТ-9 и 24 нМ скремблированной миПНК или миПНК, нацеленной на мПНК SSPN (миПНК SSPN). В клетках, обработанных контролем-носителем, миПНК SSPN снижала мПНК SSPN на 76% по сравнению с контролем скремблирования (фиг. 12). В клетках, обработанных скремблированной миПНК и ОТ-9, мПНК SSPN увеличивалась до 1,4 раза по сравнению с контрольным носителем. В клетках, обработанных миПНК SSPN и ОТ-9, уровни SSPN были снижены по сравнению с их соответствующими скремблированными контролями миПНК. Однако даже с миПНК SSPN ОТ-9 увеличивал уровни мПНК SSPN из-за неполного нокдауна, что привело нас к использованию более высокой концентрации миПНК в последующих экспериментах.

Чтобы оценить влияние нокдауна SSPN на стабильность мембраны в отсутствие обработки каким-либо соединением, мы трансфицировали мышечные трубочки *mdx* 24 и 48 нМ скремблированной миПНК или миПНК SSPN и подвергали клетки осмотическому шоку растворами 45 мОсмол. В клетках, трансфицированных 24 нМ миПНК, нокдаун SSPN не влиял на высвобождение СК (фиг. 5с). Однако в клетках, трансфицированных 48 нМ миПНК, нокдаун SSPN увеличивал высвобождение СК с 9% до 13%, указывая на то, что потеря самого SSPN делает сарколемму более восприимчивой к повреждению мембраны. Чтобы не смешивать данные с изменениями исходного уровня высвобождения СК, вызванными нокдауном SSPN, мы выбрали концентрацию миПНК 24 нМ для последующих исследований, поскольку она не влияла на исходный уровень высвобождения СК. Мы обработали мышечные трубочки *mdx* 10 мкМ ОТ-9 параллельно с 24 нМ скремблированной миПНК или миПНК SSPN в течение 48 часов до осмотического шока и обнаружили, что истощение SSPN увеличивает высвобождение СК с 6,5% до 8% (фиг. 5d). Результаты показали, что нокдаун SSPN снижает способность ОТ-9 стабилизировать сарколемму, указывая на то, что экспрессия SSPN необходима для полного мембраностабилизирующего эффекта ОТ-9.

ОТ-9 и ОТ-9m повышают экспрессию гена SSPN у мышей *mdx*

После демонстрации способности ОТ-9 увеличивать количество белка SSPN и адгезионных комплексов, связывающих ламинин, на мембране, что, в свою очередь, приводило к улучшению стабильности мембраны в мышечных трубочках с дефицитом дистрофина, мы затем исследовали способность ОТ-9 увеличивать экспрессию гена SSPN *in vivo*. Оценка стабильности ОТ-9 выявила большую разницу в периоде полувыведения соединения в плазме крови мыши (7,7 часа) по сравнению с PBS (49 минут) (фиг. 13 и 14).

Поскольку среда для культивирования клеток отличается от обоих растворов, мы количественно оценили стабильность мРНК SSPN в мышечных трубочках C2C12, обработанных 5 мкМ ОТ-9 в течение 4 часов, чтобы определить, может ли кратковременная обработка вызвать экспрессию SSPN. Через 4 часа обработки ОТ-9 среду, содержащую соединение, удаляли и заменяли на свежую среду. Клетки собирали через 0, 4, 24 и 48 часов после удаления соединения (фиг. 6а). Сразу же после удаления соединения (0 ч.) уровни мРНК SSPN повышались в 1,5 раза по сравнению с контрольным носителем, демонстрируя, что ОТ-9 индуцирует экспрессию гена SSPN уже через 4 часа обработки (фиг. 6б). Однако через 4, 24 и 48 часов после удаления соединения уровни мРНК SSPN возвращались к исходным уровням, что позволяет предположить, что мРНК SSPN повышалась в течение 4 часов после индукции с помощью ОТ-9.

Чтобы оценить безопасность и активность ОТ-9 *in vivo*, мы провели два поисковых исследования на мышах дикого типа C57/Bl6 и *mdx*. Для предварительной оценки безопасности ОТ-9 мы провели внутрибрюшинные инъекции 6-месячным самцам линии C57/Bl6. Мышам вводили носитель, 30 мг/кг ОТ-9 или 50 мг/кг ОТ-9 (n=1). Признаков воспаления, некроза или накопления соединения в месте инъекции не наблюдалось. Печень, почки, поджелудочная железа и кишечник имели нормальный вес и размер. Поскольку в растворе ОТ-9 с концентрацией 50 мг/кг наблюдалось некоторое количество нерастворимых частиц, для оценки активности *in vivo* была выбрана концентрация 30 мг/кг.

После предварительной оценки безопасности мы проверили способность ОТ-9 увеличивать экспрессию гена SSPN *in vivo*. Мы выбрали оценку активности после 4 часов обработки на основании результатов, представленных на фиг. 8б, которые продемонстрировали, что 4 часа обработки ОТ-9 было достаточно для значительного повышения уровней мРНК SSPN *in vitro*. Пять 20-недельных однопаметных самцов *mdx* подвергали внутримышечным инъекциям в обе мышцы передней (ТА) большеберцовой кости. Двум мышам вводили носитель в обе ТА, а двум мышам вводили 3 мг/кг ОТ-9 (молярный эквивалент 9,4 мМ, используемый в оценке безопасности). После 4 часов обработки ТА собирали и обрабатывали для анализа экспрессии генов. Никаких побочных эффектов после местных инъекций ОТ-9 у мышей не наблюдалось. ОТ-9 индуцировал 1,7-кратное увеличение экспрессии гена SSPN по сравнению с контрольной группой, обработанной носителем, демонстрируя, что ОТ-9 способен увеличивать экспрессию гена SSPN у мышей *mdx* (фиг. 6с). После определения того, что ОТ-9 способен увеличивать экспрессию гена SSPN *in vivo*, мы оценили одно из его производных, ОТ-9m, на его способность увеличивать экспрессию SSPN у мышей *mdx*. ОТ-9m был выбран на основе его улучшенной активности *in vitro* по сравнению с ОТ-9 (сравните, таблица 1, позиции 1 и 14). Для оценки активности ОТ-9m *in vivo* после местного введения, одиннадцать самцов мышей *mdx* в возрасте 19-22 недель подвергали внутримышечным инъекциям в обе мышцы передней (ТА) большеберцовой кости. Четырём мышам вводили носитель в обе ТА, трем мышам вводили 3 мг/кг ОТ-9m и четырём мышам вводили 10 мг/кг ОТ-9m. После 4 часов обработки ТА собирали и обрабатывали для анализа экспрессии генов. Никаких побочных

эффектов после местных инъекций ОТ-9m у мышей не наблюдалось. Подобно ОТ-9, внутримышечные инъекции ОТ-9m мышам *mdx* показали, что ОТ-9m в дозе 3 мг/кг и 10 мг/кг увеличивает экспрессию гена SSPN всего за 4 часа (фиг. 6d).

После местного введения мы оценивали способность ОТ-9m усиливать экспрессию SSPN у мышей *mdx* после системного лечения. Самцам *mdx* в возрасте 13 недель вводили подкожно носитель (4% ПЭГ-200 в гидроксипропил- β -циклодекстрине) или 20 мг/кг ОТ-9m в день. После 13 дней лечения четырехглавую мышцу, ТА и сердечную мышцу собирали и обрабатывали четырехглавую мышцу для анализа экспрессии генов. Системная обработка ОТ-9m приводила к двукратному увеличению транскрипта SSPN (фиг. 6e). Ранее мы исследовали уровни саркоспана, необходимые для спасения патологии заболевания у мышей *mdx* через доступность мышечных линий, экспрессирующих различные уровни саркоспана. Мы определили, что мыши с избыточной экспрессией саркоспана в 1,5 раза не были спасены, в то время как мыши с избыточной экспрессией саркоспана в 3 раза были спасены. Это продемонстрировало, что уровень сверхэкспрессии саркоспана, необходимый для спасения мышей *mdx*, составляет где-то от 1,5 до 3 раз. Обработка мышей *mdx* ОТ-9 и ОТ-9m показала, что оба соединения способны повышать экспрессию гена SSPN у мышей *mdx* до уровней, близких к желаемому увеличению в 1,5-3 раза.

Пример 1: Получение иллюстративных соединений

Схема синтеза А

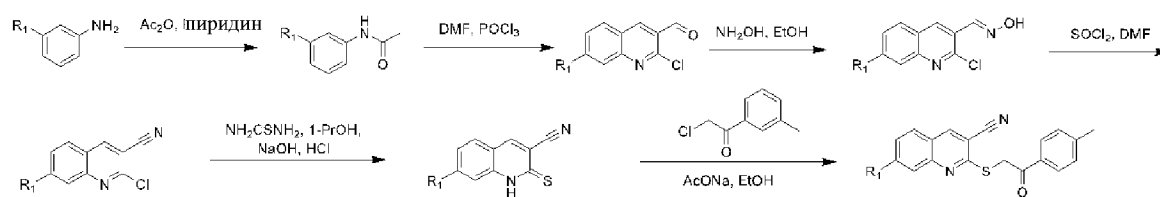
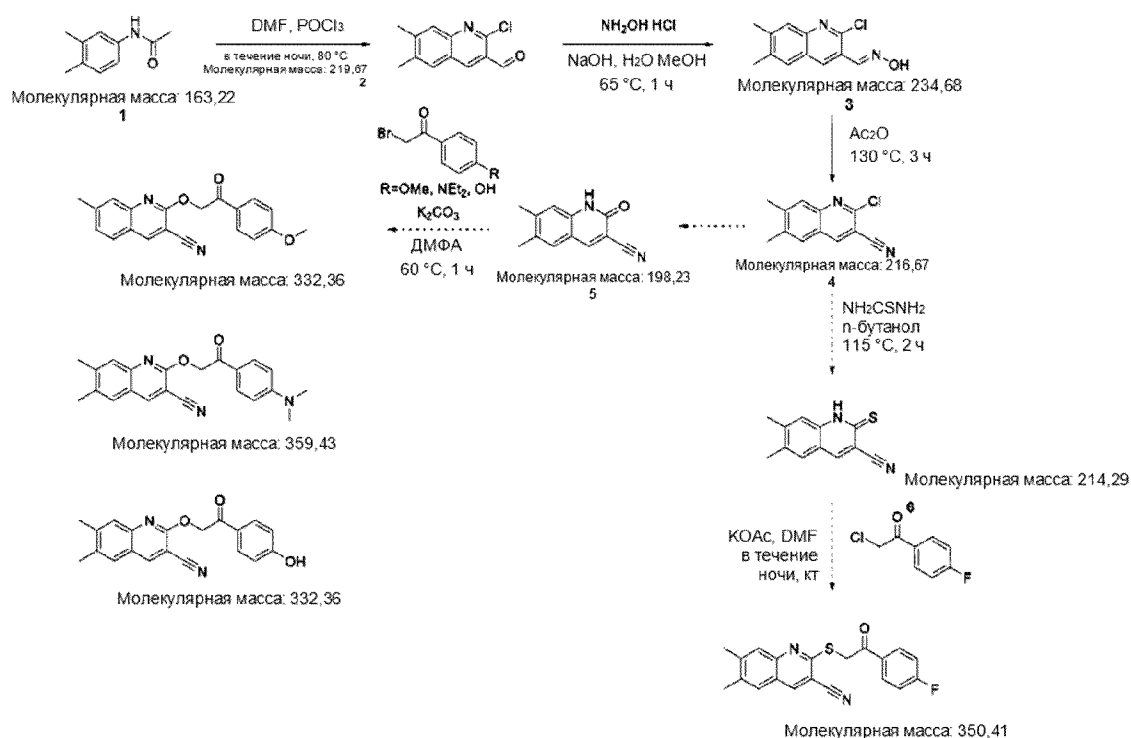


Схема синтеза В



1.1 2-Хлор-6,7-диметилхинолин-3-карбальдегид. Стадия 1. POCl₃ (13,7 мл, 147 ммоль, 6 экв.) добавляли по каплям к DMF (5,7 мл, 73,5 ммоль, 3 экв.) при 0 °C и перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем при комнатной температуре добавляли N-(3,4-диметилфенил)ацетамид (4 г, 24,5 ммоль, 1,0 экв.), затем реакционную смесь нагревали до 80 °C и перемешивали в течение 16 часов. После завершения смеси давали остыть до комнатной температуры и затем выливали в холодную воду. Водный слой затем экстрагировали EtOAc, а органический слой промывали солевым раствором, фильтровали, сушили над сульфатом натрия и затем концентрировали. Затем неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (2% EtOAc:хлороформ) с получением чистого продукта в виде белого твердого вещества (2,85 г, 52%).

1.2 (E)-2-Хлор-6,7-диметилхинолин-3-карбальдегидоксим. Стадия 2. К раствору гидрохлорида гидроксилamina (609 мг, 8,77 ммоль, 1,2 экв.) и метанола (15 мл) при 0 °C добавляли раствор гидроксида натрия (409 мг, 10,23 ммоль, 1,4 экв. в 5,37 мл воды) с последующим порционным добавлением соединения 2 (1,605 г, 7,31 ммоль, 1 экв.) в течение 10 минут. Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником при 65 °C в течение 1 ч. Когда потребление исходного материала подтверждалось с помощью ТСХ, реакционной смеси давали охладиться до комнатной температуры, фильтровали и промывали ледяной водой и гексанами. Гексановый слой выпаривали в вакууме с получением целевого продукта в виде грязно-белого твердого вещества (1,6 г, 94%).

Оставшееся 1,2 г исходного материала продвигали через условия, получая продукт (1,19 г, 94%).

1.3 2-Хлор-6,7-диметилхинолин-3-карбонитрил. Стадия 3. Соединение 3 в уксусном ангидриде (17 мл) кипятили с обратным холодильником при 130°C в течение 3 ч. После подтверждения завершения реакции с помощью ТСХ (10% EtOAc: гексаны) смеси давали охладиться до комнатной температуры и избыток растворителя выпаривали. Оставшееся твердое вещество перемешивали в EtOAc в течение 1 ч., затем твердое вещество фильтровали и промывали EtOAc (2 x 20 мл). Твердое вещество затем очищали колоночной хроматографией (0-100% ДХМ: гексаны) с получением чистого продукта в виде белого твердого вещества. Фильтрат также промывали 40 мл ледяной воды, сушили над сульфатом натрия и выпаривали с получением неочищенного материала. Этот материал затем очищали колоночной хроматографией (0-100% ДХМ: гексаны) с получением чистого продукта в виде белого твердого вещества. Два твердых вещества объединяли (461 мг, 31%). Дополнительно 1,19 г соединения 3 переносили через реакцию с получением продукта в виде белого твердого вещества (620 мг, 56%).

1.4 6,7-Диметил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбонитрил. Стадия 4. Смесь соединения 4 (274 мг, 1,27 ммоль, 1 экв.) и концентрированной хлористоводородной кислоты (25,4 мл) в метаноле (12,6 мл) кипятили с обратным холодильником в течение 4 ч. После завершения реакции смеси давали остыть до комнатной температуры и продукт удаляли из смеси. Продукт фильтровали и промывали ацетоном (2x20 мл) с получением продукта в виде грязно-белого твердого вещества (100 мг, 40%). Дополнительно 620 мг **соединения 4 переносили через реакцию с получением продукта в виде рыхлого грязно-белого твердого вещества (267 мг, 47%).**

1.5 Способ получения 2-(2-(4-метоксифенил)-2-оксоэтокси)-7-метилхинолин-3-карбонитрила. Стадия 5. К раствору соединения 5 (50 мг, 0,25 ммоль, 1,0 экв.) в DMF (0,5 мл) добавляли безводный карбонат калия (52,3 мг, 0,375 ммоль, 1,5 экв.), а затем кетон (58 мг, 0,25 ммоль, 1,0 экв.). Полученную смесь затем перемешивали при 60°C в течение ночи. После завершения реакции, подтвержденной ТСХ (5% MeOH: ДХМ), реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли водой. Водный слой затем экстрагировали этилацетатом. Органический слой затем промывали холодной водой и солевым раствором. Органический слой затем фильтровали, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Неочищенный материал затем очищали колоночной хроматографией (40% EtOAc: гексаны) с получением чистого продукта.

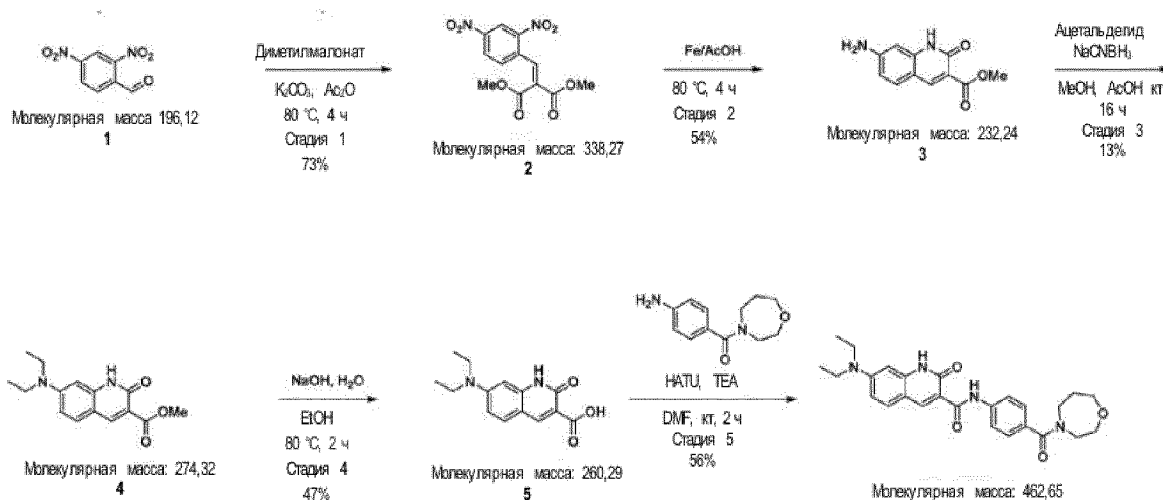
1.6 Способ получения 2-(2-(4-(диметиламино)фенил)-2-оксоэтокси)-6,7-диметилхинолин-3-карбонитрила. Стадия 5. К раствору соединения 5 (75 мг, 0,38 ммоль, 1,0 экв.) в DMF (0,5 мл) добавляли безводный карбонат калия (78,4 мг, 0,568 ммоль, 1,5 экв.), а затем кетон (91,6 мг, 0,38 ммоль, 1,0 экв.). Полученную смесь затем перемешивали при 60°C в течение ночи. После завершения реакции, подтвержденной ТСХ (5% MeOH: ДХМ), реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли водой. Водный слой затем экстрагировали этилацетатом. Органический слой затем промывали

холодной водой и солевым раствором. Органический слой затем фильтровали, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Неочищенный материал затем очищали колоночной хроматографией (40% EtOAc: гексаны) и препаративной ВЭЖХ с получением чистого продукта.

Молекулярная Структура	Бромид	Выход	[M+H] ⁺	Аннотированный Н ЯМР
		12,3 мг, 14%	347,4	1H ЯМР (300 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ ppm 8,31 (s, 1 H) 7,96 - 8,04 (m, 2 H) 7,46 (s, 2 H) 6,96 - 7,01 (m, 2 H) 5,75 (s, 2 H) 3,89 (s, 3 H) 2,38 (s, 6 H)
		4,6 мг, 3%	360,4	1H ЯМР (400 МГц, АЦЕТОНИТРИЛ-d3) δ ppm 8,43 (s, 1 H) 8,00 (d, J=9,00 Гц, 2 H) 7,53 (s, 1 H) 7,08 (s, 1 H) 6,83 (d, J=9,26 Гц, 2 H) 5,73 (s, 2 H) 3,11 (s, 7 H) 2,35 (s, 3 H) 2,34 (s, 3 H)

1.7 Способ получения 2-((2-(4-фторфенил)-2-оксоэтил)тио)-6,7-диметилхинолин-3-карбонитрила. Стадия 5. Соединение **5** (169 мг, 0,79 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в безводном DMF (6,76 мл) при 60°C и затем охлаждали до комнатной температуры. Затем добавляли ацетат калия (155 мг, 1,58 ммоль, 2,0 экв.) и 2-бром-1-(4-фторфенил)этан-1-он (342 мг, 1,58 ммоль, 2,0 экв.) и реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение ночи. После подтверждения завершения реакции с помощью ТСХ (100% ДХМ) к реакционной смеси добавляли 20 мл воды. Выпавшее бледно-желтое твердое вещество затем отфильтровывали. Затем твердое вещество повторно растворяли в смеси ДХМ:MeOH (10%) и сушили над безводным сульфатом натрия. Затем твердое вещество растворяли в 40 мл смеси ДХМ:MeOH (5%) и пропускали через пробку, используя ДХМ, с получением продукта в виде бледно-желтого твердого вещества (185 мг, 69%). [M+H]⁺= 351,4. 1H ЯМР (300 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ=8,23 (s, 1H), 8,20-8,12 (m, 2H), 7,48 (s, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,23 (d, J=8,2 Гц, 2H), 4,75 (s, 2H), 2,39 (d, J=2,3 Гц, 6H).

Схема синтеза С



2.1 Диметил-2-(2,4-динитробензилиден)малонат. Стадия 1. К смеси 2,4-

динитробензальдегида (500 мг, 2,55 ммоль, 1,0 экв.) в уксусном ангидриде (1,09 мл) добавляли диметилмалонат (336,8 мг, 2,55 ммоль, 1,0 экв.), а затем безводный карбонат калия (528,5 мг, 3,82 ммоль, 1,5 экв.). Полученную реакционную смесь нагревали до 80°C и перемешивали в течение 4 часов. После того, как завершение реакции подтверждали с помощью ТСХ (100% ДХМ), в смесь вливали холодную воду и экстрагировали этилацетатом. Затем органический слой промывали солевым раствором, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали, получая неочищенный продукт. Затем продукт очищали колоночной хроматографией (90% ДХМ:гексаны) с получением чистого продукта (575 мг, 73%).

2.2 Метил-7-амино-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксилат. Стадия 2. К соединению 2 (540 мг, 1,74 ммоль, 1,0 экв.) в АсОН (5,8 мл) добавляли порошок железа (1,94 г, 34,81 ммоль, 20 экв.) при комнатной температуре. Полученную смесь нагревали до 80°C и перемешивали в течение 4 часов. После завершения реакции, подтвержденной ТСХ (5% MeOH:DCM), реакционную смесь фильтровали через целит и промывали этилацетатом. Фильтрат подщелачивали бикарбонатом натрия и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали солевым раствором, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и выпаривали при пониженном давлении с получением продукта (207 мг, 54%), который без очистки переносили на следующую стадию.

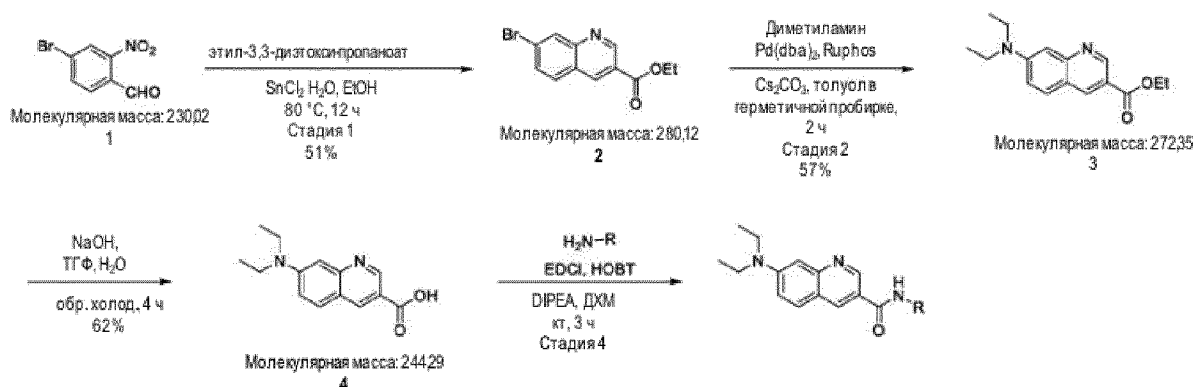
2.3 Метил-7-(диэтиламино)-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксилат. Стадия 3. К соединению 3 (200 мг, 0,95 ммоль, 1,0 экв.) в метаноле (2,37 мл) добавляли ацетальдегид (0,46 мл, 8,3 ммоль, 8,75 экв.) при комнатной температуре с последующим добавлением уксусной кислоты (0,46 мл) и цианборгидрида натрия (46,5 мг, 0,73 ммоль, 0,78 экв.). Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. После завершения реакции, подтвержденной ТСХ (10% MeOH:ДХМ), реакционную смесь разбавляли ДХМ и промывали холодной водой и солевым раствором. Органический слой фильтровали, сушили над сульфатом натрия и выпаривали, получая неочищенный продукт, который затем очищали колоночной хроматографией (30% EtOAc:ДХМ), получая продукт (30 мг, 13%).

2.4 7-(Диэтиламино)-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновая кислота. Стадия 4. К соединению 4 (30 мг, 0,109 ммоль, 1,0 экв.) в EtOH (0,9 мл) при 0°C добавляли раствор NaOH (21,9 мг, 0,547 ммоль, 5,0 экв. в 0,6 мл воды). Затем реакционной смеси давали возможность перемешиваться при 80°C в течение 2 часов. После завершения реакции смесь выливали в холодную воду и доводили pH до 5 с помощью 5% раствора лимонной кислоты. Образовавшееся твердое вещество собирали фильтрованием и промывали водой и диэтиловым эфиром с получением продукта (18 мг, 48%).

2.5 Способ получения конечного продукта. Стадия 5. К исходному веществу (18 мг, 0,069 ммоль, 1,0 экв.) и (4-аминофенил)(1,4-оксазепан-4-ил)метанону (18,3 мг, 0,083 ммоль, 1,2 экв.) в безводном DMF (0,54 мл) при 10°C добавляли NATU (39,4 мг, 0,104 ммоль, 1,5 экв.) и триэтиламин (0,115 мл, 0,083 ммоль, 1,2 экв.). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. После израсходования исходных материалов

реакционную смесь выливали в холодную воду и экстрагировали этилацетатом. Затем органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали. Неочищенный материал очищали с помощью препаративной ВЭЖХ с получением чистого продукта (17,9 мг, 56%). $[M+H]^+ = 463,5$. 1H ЯМР (300 МГц, $DMCO-d_6$) $\delta = 12,33$ (s, 1H), 11,96 (s, 1H), 8,68 (s, 1H), 7,72 (dd, $J=8,8, 11,1$ Гц, 3H), 7,38 (d, $J=8,2$ Гц, 2H), 6,79 (dd, $J=2,3, 8,8$ Гц, 1H), 6,54 (s, 1H), 3,66 (br s, 6H), 3,51-3,36 (m, 6H), 1,72 (br s, 2H), 1,14 (t, $J=6,7$ Гц, 6H).

Схема синтеза D



3.1 Этил-7-бромхинолин-3-карбоксилат. Стадия 1. К смеси 4-бром-3-нитробензальдегида (2,42 г, 10,51 ммоль, 1,0 экв.) в этаноле (80,8 мл) добавляли этил-3,3-диэтоксипропаноат (4 г, 21,02 ммоль, 2,0 экв.), а затем гидрат хлорида олова (10,68 г, 47,3 ммоль, 4,5 экв.). Реакцию кипятили с обратным холодильником при $80^\circ C$ в течение 12 часов. После завершения реакции этанол концентрировали под давлением. Затем смесь разбавляли EtOAc и бикарбонатом натрия и перемешивали в течение 30 минут. Затем смесь фильтровали через целит для удаления нерастворенных солей. Органический слой отделяли, а водный слой затем экстрагировали EtOAc (2x). Объединенные органические слои фильтровали, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Затем неочищенный продукт промывали гексаном, фильтровали и сушили при пониженном давлении с получением чистого продукта (1,5 г, 51%).

3.2 Этил-7-(диэтиламино)хинолин-3-карбоксилат. Стадия 2. К раствору соединения 2 (1,4 г, 4,998 ммоль, 1,0 экв.) в толуоле (139 мл) добавляли диэтиламин (1,8 мл, 17,5 ммоль, 3,5 экв.). Смесь продували аргоном в течение 15 минут с последующим добавлением $Pd_2(dba)_3$ (458 мг, 0,4998 ммоль, 0,1 экв.), RuPhos (466 мг, 0,9996 ммоль, 0,2 экв.) и карбоната цезия (5,94 г, 18,24 ммоль, 3,65 экв.). Полученную смесь нагревали до температуры кипения с обратным холодильником и перемешивали в течение 2 часов. После завершения реакции реакционную смесь разбавляли этилацетатом и фильтровали. Фильтрат промывали водой и солевым раствором. Затем органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и выпаривали при пониженном давлении, получая неочищенный материал. Неочищенный материал затем очищали колоночной хроматографией (0-20% EtOAc:гексаны) с получением чистого продукта (779 мг, 57%).

3.3 7-(Диэтиламино)хинолин-3-карбоновая кислота. Стадия 3. К раствору соединения 3 (779 мг, 2,86 ммоль, 1 экв.) в ТГФ (7,6 мл) добавляли раствор NaOH (629 мг, 15,7 ммоль, 5,5 экв. в 7,6 мл воды) при комнатной температуре. Полученную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 4 часов. После завершения реакции, подтвержденной ТСХ (10% MeOH:ДХМ), избыток ТГФ выпаривали, оставшийся остаток разбавляли водой и промывали этилацетатом. pH водного слоя доводили до 5 с помощью 10% водного раствора лимонной кислоты и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали солевым раствором, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали с получением продукта в виде твердого вещества желтого цвета (431 мг, выход 62%).

3.4 Общая процедура получения конечных продуктов. Стадия 4. К раствору соединения 4 (50 мг, 0,205 ммоль, 1,0 экв.) в ДХМ (2,1 мл) добавляли амин (0,184 ммоль, 0,9 экв.), а затем DIPEA (0,071 мл, 0,409 ммоль, 2,0 экв.), HOBT (34,5 мг, 0,225 ммоль, 1,1 экв.) и EDCI (43,2 мг, 0,225 ммоль, 1,1 экв.). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. После завершения реакции, подтвержденной ТСХ (5% MeOH:ДХМ), смесь разбавляли ДХМ и промывали холодной водой, солевым раствором, фильтровали, сушили над сульфатом натрия и выпаривали с получением неочищенного соединения. Продукт очищали колоночной хроматографией (2% MeOH:EtOAc).

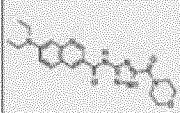
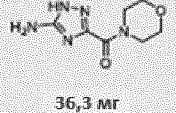
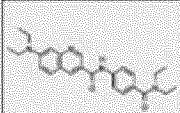
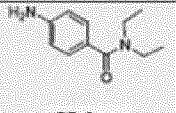
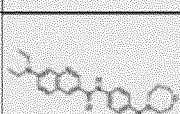
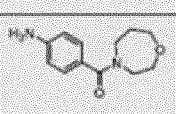
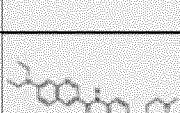
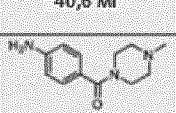
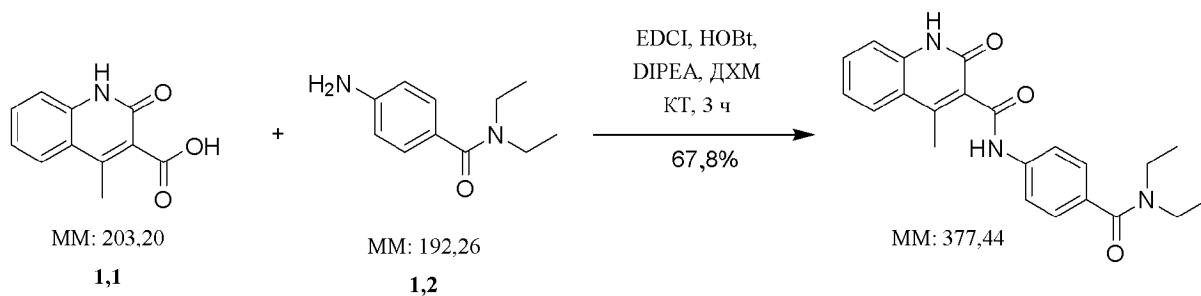
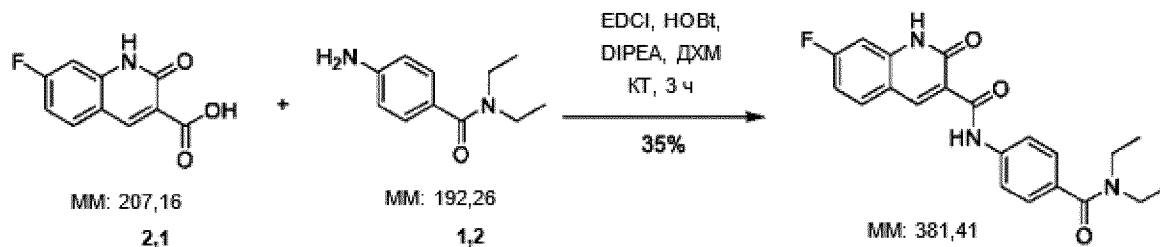
Молекулярная структура	Амин	Выход	[M+H] ⁺	Аннотированный Н ЯМР
	 36,3 мг	51 мг, 59%	424,0	1H ЯМР (300 МГц, МЕТАНОЛ-d4) δ ppm 9,24 (d, J=2,34 Гц, 1 H) 9,03 (d, J=2,34 Гц, 1 H) 7,85 (d, J=8,79 Гц, 1 H) 7,32 (dd, J=9,08, 2,64 Гц, 1 H) 7,02 (d, J=2,34 Гц, 1 H) 3,81 - 3,87 (m, 2 H) 3,73 - 3,79 (m, 4 H) 3,69 - 3,72 (m, 2 H) 3,60 (q, J=7,03 Гц, 4 H) 1,25 - 1,31 (m, 6 H)
	 35,4 мг	20,5 мг, 24%	419,2	1H ЯМР (300 МГц, МЕТАНОЛ-d4) δ ppm 9,10 (d, J=1,76 Гц, 1 H) 8,67 (d, J=2,34 Гц, 1 H) 7,86 (dd, J=8,79, 1,76 Гц, 4 H) 7,41 (d, J=8,79 Гц, 2 H) 7,33 (dd, J=9,08, 2,64 Гц, 1 H) 7,05 (d, J=2,34 Гц, 1 H) 3,59 (q, J=7,03 Гц, 7 H) 1,28 (br t, J=7,03 Гц, 12 H)
	 40,6 мг	41 мг, 45%	447,0	1H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d6) δ ppm 9,13 (d, J=2,34 Гц, 1 H) 8,66 (d, J=1,76 Гц, 1 H) 7,79 - 7,90 (m, 3 H) 7,40 (d, J=8,79 Гц, 2 H) 7,29 (dd, J=9,38, 2,93 Гц, 1 H) 6,99 (d, J=2,34 Гц, 1 H) 3,58 - 3,75 (m, 6 H) 3,51 (m, J=7,42, 7,42, 7,42 Гц, 6 H) 1,79 - 1,91 (m, 1 H) 1,68 - 1,78 (m, 1 H) 1,15 - 1,20 (m, 7 H)
	 40,4 мг	30 мг, 33%	446,6	1H ЯМР (300 МГц, МЕТАНОЛ-d4) δ ppm 9,22 (br s, 2 H) 8,11 (br d, J=9,38 Гц, 1 H) 7,94 (br d, J=8,21 Гц, 2 H) 7,50 - 7,66 (m, 3 H) 7,00 (s, 1 H) 3,64 - 3,74 (m, 4 H) 3,42 - 3,64 (m, 4 H) 3,32 - 3,37 (m, 1 H) 3,13 - 3,29 (m, 3 H) 2,96 (s, 3 H) 1,32 (br t, J=7,03 Hz, 6 H)

Схема 1. Схема синтеза N-(4-(диэтилкарбамоил)фенил)-4-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксиамида



N-(4-(Диэтилкарбамоил)фенил)-4-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксамид: к раствору соединения-1.1 (50,0 мг, 0,246 ммоль) в безводном дихлорметане (2 мл) добавляли соединение-1.2 (42,6 мг, 0,221 ммоль) с последующим добавлением EDCI (51,9 мг, 0,271 ммоль), HOBT (36,6 мг, 0,271 ммоль) и DIPEA (0,0857 мл, 0,492 ммоль) при 20°C, и в результате реакцию смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном и промывали водой. Водный слой экстрагировали этилацетатом и объединенные органические слои сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и выпаривали при пониженном давлении. Полученное неочищенное соединение очищали с использованием колоночной флеш-хроматографии с силикагелем на 12 г с элюированием MeOH: ДХМ (от 0 до 10%), получали желаемый продукт в виде белого твердого вещества (63 мг, 67,8%). (+esi)[M+H]⁺=378,2, ¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ=12,00 (s, 1H), 10,55 (s, 1H), 7,82 (d, J= 7,6 Гц, 1H), 7,73 (d, J= 8,2 Гц, 2H), 7,62-7,52 (m, 1H), 7,39-7,15 (m, 4H), 3,42-3,14 (m, 4H), 2,43 (s, 3H), 1,09 (br s, 6H).

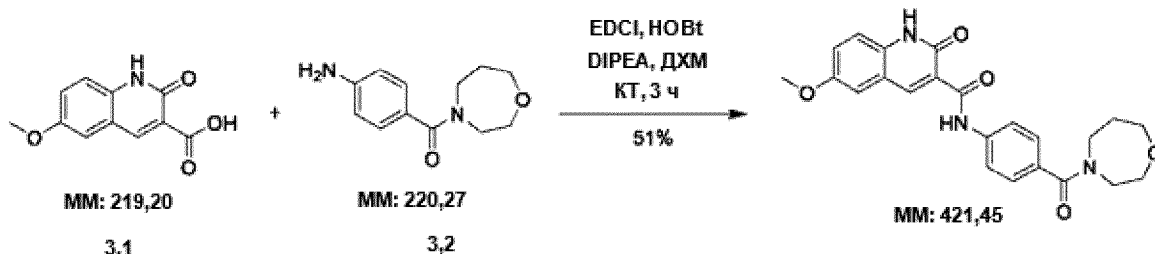
Схема 2. Схема синтеза N-(4-(диэтилкарбамоил)фенил)-7-фтор-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксамида



N-(4-(Диэтилкарбамоил)фенил)-7-фтор-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксамид К раствору соединения-2.1 (50 мг, 0,241 ммоль) в безводном дихлорметане (2 мл) добавляли соединение-1.2 (41,8 мг, 0,217 ммоль) с последующим добавлением EDCI (50,9 мг, 0,265 ммоль), HOBT (35,9 мг, 0,265 ммоль) и DIPEA (0,0841 мл, 0,483 ммоль) при 20°C, и полученную реакцию смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном и промывали водой. Водный слой экстрагировали этилацетатом и объединенные органические слои сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и выпаривали при пониженном давлении. Полученное неочищенное соединение очищали с использованием колоночной флеш-хроматографии с силикагелем на 12 г, элюируя MeOH: ДХМ (от 0 до 10%) с получением желаемого продукта вместе с некоторыми примесями. Наконец, соединение растирали с

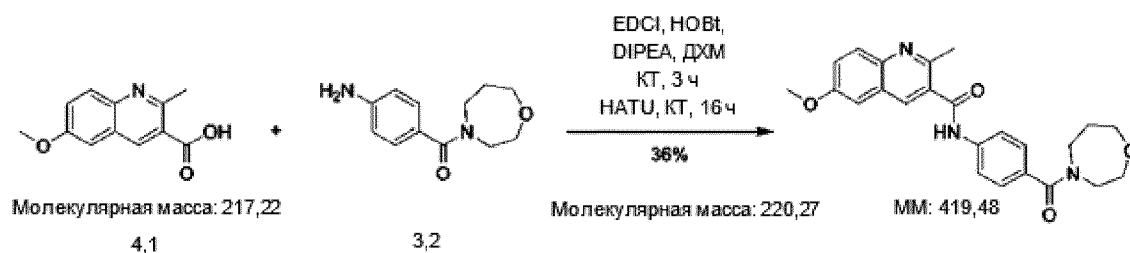
30% гексаном в ДХМ, что давало желаемый продукт в виде грязно-белого твердого вещества (32 мг, 35%). $(+esi)[M+H]^+=382,2$. 1H ЯМР (300 МГц, $DMCO-d_6$) $\delta=12,74$ (s, 1H), 12,11 (s, 1H), 8,99 (s, 1H), 8,12 (dd, $J=6,4, 8,8$ Гц, 1H), 7,76 (d, $J=8,2$ Гц, 2H), 7,36 (d, $J=8,2$ Гц, 2H), 7,28-7,11 (m, 2H), 3,47-3,16 (m, 4H), 1,09 (br s, 6H).

Схема 3. Схема синтеза соединения N-(4-(1,4-оксазепан-4-карбонил)фенил)-6-метокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксамида



N-(4-(1,4-Оксазепан-4-карбонил)фенил)-6-метокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксамид: к раствору соединения-**3.1** (50 мг, 0,228 ммоль) в безводном дихлорметане (2 мл) добавляли соединение-**3.2** (45,2 мг, 0,205 ммоль) с последующим добавлением EDCI (48,1 мг, 0,251 ммоль), HOBT (33,9 мг, 0,251 ммоль) и DIPEA (0,0795 мл, 0,456 ммоль) при 20°C, и полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. После завершения реакции реакционную смесь разбавляли дихлорметаном и промывали водой. Водный слой экстрагировали этилацетатом и объединенные органические слои сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и выпаривали. Полученное неочищенное соединение очищали с помощью колоночной флеш-хроматографии с силикагелем на 12 г, элюируя MeOH: ДХМ (от 0 до 5%) вместе с некоторым количеством анилина (**3.2**) с получением желаемого продукта. Наконец, очищали с помощью PLC с использованием ДХМ: ацетон: гексан (40:40:20) и сушили с получением желаемого продукта в виде бледно-желтого твердого вещества (49 мг, 51%), $(+esi)[M+H]^+=422,2$. 1H ЯМР (300 МГц, $DMCO-d_6$) $\delta=12,64$ (s, 1H), 12,42 (s, 1H), 8,95 (s, 1H), 7,77 (br d, $J=8,2$ Гц, 2H), 7,57 (d, $J=2,3$ Гц, 1H), 7,46-7,28 (m, 4H), 3,81 (s, 3H), 3,73-3,41 (m, 8H), 1,92-1,66 (m, 2H).

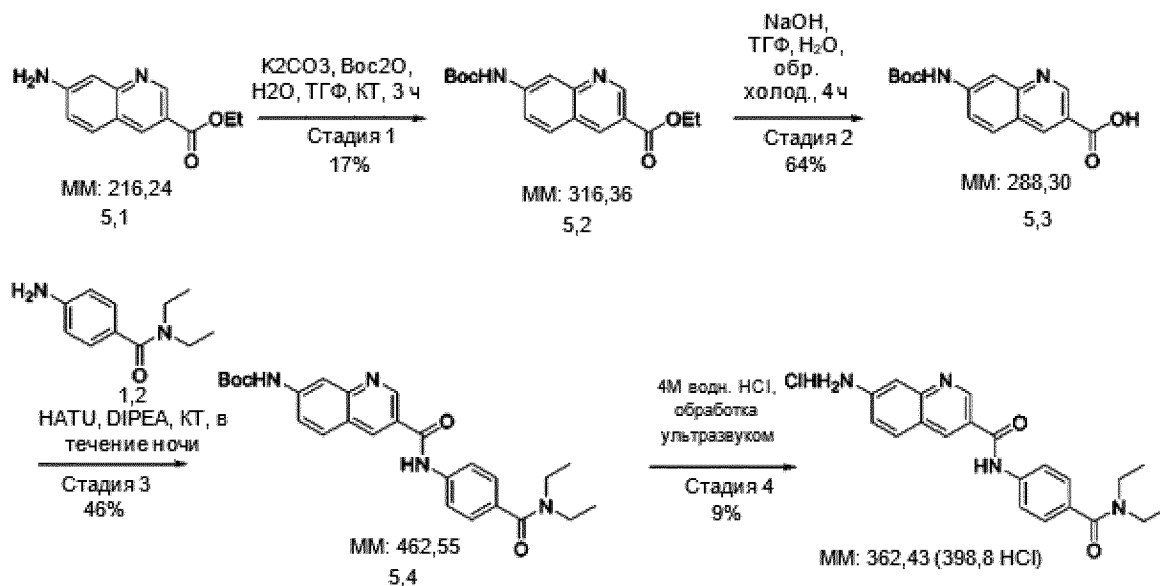
Схема 4. Схема синтеза соединения N-(4-(1,4-оксазепан-4-карбонил)фенил)-6-метокси-2-метилхинолин-3-карбоксамида



N-(4-(1,4-Оксазепан-4-карбонил)фенил)-6-метокси-2-метилхинолин-3-карбоксамид: К раствору соединения-**4.1** (53,0 мг, 0,244 ммоль) в безводном дихлорметане

(2,12 мл) добавляли соединение-**3.2** (48,4 мг, 0,220 ммоль) с последующим добавлением EDCI (51,4 мг, 0,268 ммоль), HOBT (36,3 мг, 0,268 ммоль) и DIPEA (0,085 мл, 0,488 ммоль) при 20°C, и полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. ТСХ и ЖХ-МС не показали признаков образования какого-либо продукта. Поэтому добавляли NATU (139 мг, 0,366 ммоль, 1,5 экв.) и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном и промывали водой. Водный слой экстрагировали этилацетатом и объединенные органические слои сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и выпаривали. Полученное неочищенное соединение очищали с использованием колоночной флеш-хроматографии с силикагелем на 12 г, элюировали смесью MeOH:ДХМ (от 0 до 30%), необходимые фракции концентрировали, растворяли в ДХМ и промывали насыщенным раствором NaHCO₃, органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Соединение снова очищали с использованием колоночной флеш-хроматографии с силикагелем на 12 г с элюированием MeOH: ДХМ (от 0 до 10%), получали желаемый продукт в виде бледно-желтого твердого вещества (37 мг, 36%). (+esi)[M+H]⁺= 420,2. ¹H ЯМР (300 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ=8,14 (s, 1H), 7,95 (d, J= 9,4 Гц, 1H), 8,04-7,83 (m, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,52-7,28 (m, 3H), 7,03 (d, J= 2,3 Гц, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,87-3,53 (m, 9H), 2,84 (s, 3H), 1,94-1,55 (m, 2H).

Схема 5. Схема синтеза соединения 7-амино-N-(4-(диэтилкарбамоил)фенил)хинолин-3-карбоксамида



Этил-7-((трет-бутоксикарбонил)амино)хинолин-3-карбоксилат. Стадия 1. К перемешиваемому раствору соединения-**5.1** (100 мг, 0,462 ммоль) в тетрагидрофуране (1 мл) и H₂O (8,33 мг, 0,462 ммоль) добавляли полуторагидрат карбоната калия (128 мг, 0,925 ммоль). Примерно через пять минут добавляли ди-трет-бутилдикарбонат (118 мг, 0,541 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 3 часов при комнатной температуре. Смесь разбавляли водой и трижды экстрагировали этилацетатом. Объединенные

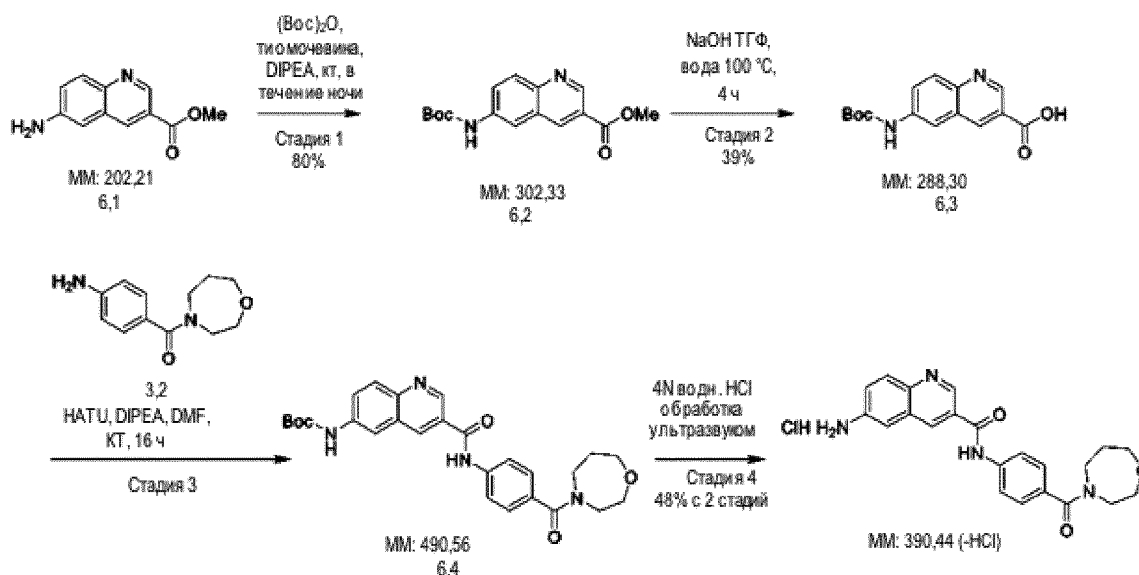
органические слои сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Продукт очищали флеш-хроматографией (0-20% EtOAc:гексан) с получением соединения **5.2** в виде светло-желтого твердого вещества (25 мг, 17%) вместе с 50 мг непрореагировавшего исходного материала.

7-((трет-Бутоксикарбонил)амино)хинолин-3-карбоновая кислота. Стадия 2. К раствору соединения-**5.2** (105 мг, 332 ммоль) в тетрагидрофуране (2 мл) добавляли гидроксид натрия (26,6 мг, 0,665 ммоль) и полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 56 часов. Избыток растворителя удаляли перегонкой при пониженном давлении, pH остатка доводили до 4 с помощью 0,1 М HCl, соединение экстрагировали этилацетатом, органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и выпаривали при пониженном давлении с получением соединения-**5.3** (62 мг, 64%). (+esi)[M+H]⁺=289,2.

трет-Бутил-(3-((4-(диэтилкарбамоил)фенил)карбамоил)хинолин-7-ил)карбамат. Стадия 3. К раствору соединения-**5.3** (62 мг, 0,22 ммоль) в диметилформамиде (1 мл) добавляли соединение-**1.2** (41 мг, 0,22 ммоль), DIPEA (83 мг, 0,65 ммоль) и HATU (120 мг, 320 ммоль) и полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом, промывали холодной водой и сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и выпаривали при пониженном давлении, получая неочищенное соединение, и очищали с помощью комбинированной флеш-хроматографии, получая чистое соединение-**5.4** в виде желтого твердого вещества (46 мг, 46%), (+esi)[M+H]⁺=463,3.

7-Амино-N-(4-(диэтилкарбамоил)фенил)хинолин-3-карбоксамид. Стадия 4. 4 М водный раствор HCl (1 мл) добавляли к соединению-**5.4** (46 мг) и перемешивали в течение 5-10 минут при комнатной температуре, а затем обрабатывали ультразвуком в течение 20 минут. Анализ ЖХ-МС указывает на образование продукта вместе с непрореагировавшим исходным материалом. К реакционной смеси добавляли метанол (2 мл) и обрабатывали ультразвуком с последующим удалением метанола. Остаток лиофилизировали с получением гигроскопического желтого порошка (3,2 мг, 9%). (+esi)[M+H]⁺=363,2. ¹H ЯМР (300 МГц, CD₃OD) δ=9,20 (s, 1H), 9,16 (d, J= 1,8 Гц, 1H), 8,04 (d, J= 9,4 Гц, 1H), 7,89 (d, J= 8,8 Гц, 2H), 7,44 (d, J= 8,8 Гц, 2H), 7,36 (dd, J= 2,1, 9,1 Гц, 1H), 7,00 (d, J= 1,8 Гц, 1H), 3,67-3,48 (m, 2H), 3,45-3,33 (m, 2H), 1,34-1,10 (m, 6H).

Схема 6. Схема синтеза соединения гидрохлорида N-(4-(1,4-оксазепан-4-карбонил)фенил)-6-аминохинолин-3-карбоксамид



Метил-6-((трет-бутоксикарбонил)амино)хинолин-3-карбоксилат. Стадия 1. К раствору соединения-6.1 (150 мг, 0,742 ммоль) в сухом тетрагидрофуране (6,0 мл) добавляли тиомочевину (5,65 мг, 0,0742 ммоль) и DIPEA (0,0646 мл, 0,371 ммоль), и полученную реакционную смесь перемешивали в течение 5 мин. при комнатной температуре, затем добавляли Вос-ангидрид (178 мг, 0,816 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. За ходом реакции следили с помощью ЖХ-МС, и она показала только 25%-ое превращение. Эту реакционную смесь концентрировали и добавляли еще 5 экв. Вос-ангидрида и 1,5 мл сухого ТГФ, реакционную смесь нагревали до 70°C и перемешивали в течение 3 часов, и ЖХ-МС показала, что превращение продукта составляет 95%. Избыток ТГФ выпаривали; к смеси добавляли воду (5 мл), экстрагировали этилацетатом (3×10 мл), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Очистка на предварительно заполненной колонке с силикагелем (12 г), элюирование гексаном в этилацетате (от 0 до 50%), обеспечивала желаемое соединение-6.2 в виде белого порошка (180 мг, 80%).

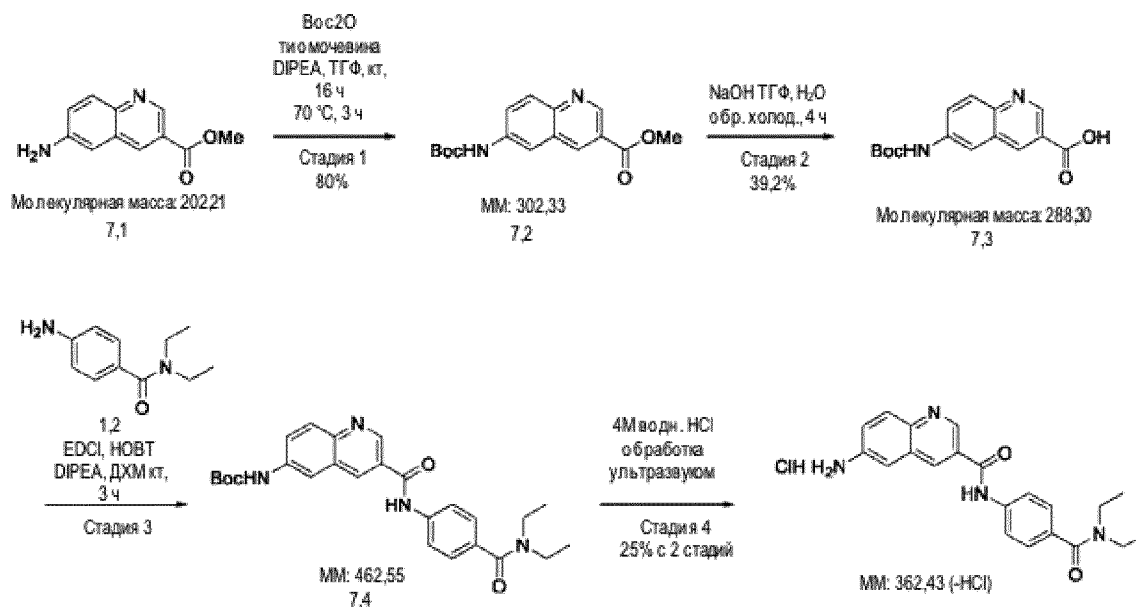
6-((трет-Бутоксикарбонил)амино)хинолин-3-карбоновая кислота. Стадия 2. В закрытую пробирку загружали соединение-6.2 (180 мг, 0,595 ммоль) и гидроксид натрия (131 мг, 3,27 ммоль) в тетрагидрофуране (1,80 мл) и воде (1,80 мл) и перемешивали при 70°C в течение 3 ч. ЖХ-МС показала 51% желаемого продукта и 45% de-boc-продукта. Затем удаляли ТГФ при пониженном давлении и неочищенный продукт разбавляли водой, промывали этилацетатом (2×5 мл). pH водного слоя доводили до 5 с помощью 10% раствора лимонной кислоты и затем экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали соевым раствором, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенное соединение очищали на предварительно заполненной колонке с силикагелем (12 г), элюировали ДХМ в MeOH (от 0 до 10%), получая желаемое соединение-6.3 (132 мг, 39%).

трет-Бутил(3-((4-(1,4-оксазепан-4-карбонил)фенил)карбамоил)хинолин-6-

ил)карбамат. Стадия 3. В высушенную пламенем герметичную пробирку загружали соединение-**6.3** (65 мг, 0,225 ммоль) и соединение-**3.2** (59,6 мг, 0,271 ммоль) в безводном диметилформамиде (1,95 мл). Затем добавляли HATU (129 мг, 0,338 ммоль) и DIPEA (0,0471 мл, 0,271 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли водой, экстрагировали этилацетатом, затем органический слой промывали водой, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и выпаривали. Полученное неочищенное соединение очищали с использованием колоночной флеш-хроматографии с силикагелем на 24 г, элюировали смесью MeOH:CHCl₃, получали желаемое соединение-**6.4** и использовали на следующей стадии.

N-(4-(1,4-Оксазепан-4-карбонил)фенил)-6-аминохинолин-3-карбоксамида гидрохлорид. Стадия 4. 4 М водный раствор HCl (1 мл) добавляли к соединению-**6.4**, полученному на стадии 3, и обрабатывали ультразвуком в течение 20 минут с последующей лиофилизацией с получением желаемого продукта соли HCl в виде желтого твердого вещества (46 мг; 48% с 2 стадий). (+esi)[M+H]⁺=391,2. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ 9,27 (d, J=1,6 Гц, 1H), 9,17 (d, J=1,8 Гц, 1H), 8,03 (d, J=9,2 Гц, 1H), 7,92 (d, J=8,0 Гц, 2H), 7,71 (dd, J=9,1, 2,4 Гц, 1H), 7,52 (d, J=7,9 Гц, 2H), 7,31 (d, J=2,5 Гц, 1H), 3,88-3,63 (m, 8H), 2,05-2,00 (m, 1H), 1,88-1,83 (m, 1H).

Схема 7. Схема синтеза хлористоводородной соли соединения 6-амино-N-(4-(диэтилкарбамоил)фенил)хинолин-3-карбоксамида



Метил-6-((трет-бутоксикарбонил)амино)хинолин-3-карбоксилат. Стадия 1. К раствору соединения-**7.1** (150 мг, 0,742 ммоль) в тетрагидрофуране (4 мл) добавляли тиомочевину (5,6 мг, 0,074 ммоль), DIPEA (47,9 мг, 0,371 ммоль) и ангидрид воска (177 мг, 0,816 ммоль) и полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. За ходом реакции следили с помощью ЖХ-МС, и она показала

образование 25% продукта. Растворитель удаляли из реакционной смеси, добавляли еще 5 экв. *vos*-ангидрида и 1,5 мл ТГФ, нагревали реакционную смесь до 70°C и перемешивали в течение 3 часов, и анализ ЖХ-МС показал образование 95% продукта. Затем растворитель удаляли при пониженном давлении, а остаток растворяли в этилацетате, промывали водой и сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и выпаривали при пониженном давлении с получением неочищенного соединения, которое очищали с помощью флеш-хроматографии на 12-граммовой колонке с 0-50% ЕА:Нех для элюирования продукта, затем 100% ЕА для элюирования непрореагировавшего исходного материала. Фракции продукта перегоняли при пониженном давлении с получением чистого соединения в виде белого соединения-7,2 (180 мг, 80%). (+esi)[M+H]⁺=303,2.

6-((трет-Бутоксикарбонил)амино)хинолин-3-карбоновая кислота. Стадия 2. К раствору соединения-7.2 (180 мг, 0,595 ммоль) в тетрагидрофуране (1,8 мл) добавляли гидроксид натрия (130 мг, 3,27 ммоль) и воду (1,8 мл), и полученную реакционную смесь перемешивали при 70°C в течение 3 часов. За ходом реакции следили с помощью ЖХ-МС, и она указывает на образование 51% целевого продукта и 45% *de-vos*-продукта. На этой стадии реакцию прекращали и избыток тетрагидрофурана удаляли при пониженном давлении, а неочищенный остаток растворяли в воде и промывали водой. Водный слой затем подкисляли до pH 5, используя 10% раствор лимонной кислоты, и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали солевым раствором и сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением соединения-7.3 (132 мг, 39,2%, чистота 51%). (+esi)[M+H]⁺=289,2.

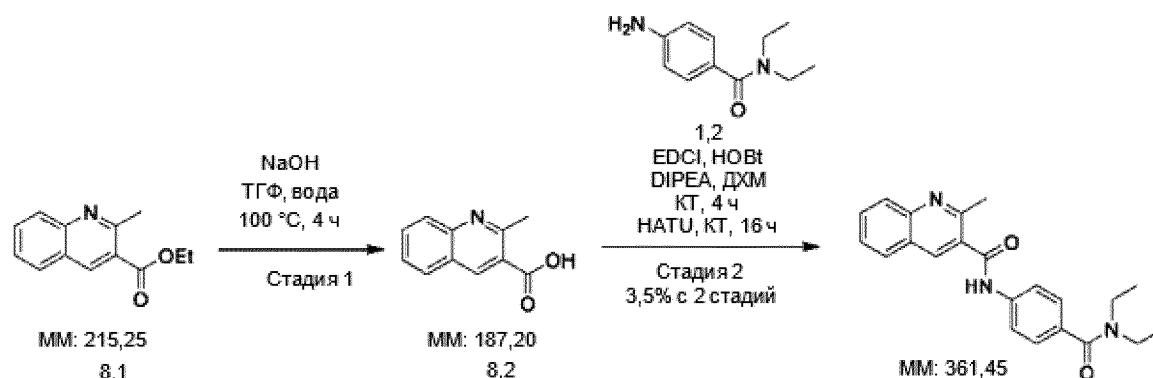
трет-Бутил-(3-((4-(диэтилкарбамоил)фенил)карбамоил)хинолин-6-ил)карбамат.

Стадия 3. К раствору соединения-7.3 (65 мг, 0,225 ммоль) в безводном DMF (1,95 мл) добавляли соединение-1.2 (52 мг, 0,271 ммоль), DIPEA (0,047 мл, 0,271 ммоль) и HATU (129 мг, 0,338 ммоль) и полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов. Реакционную смесь разводили водой и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали водой, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного соединения, и его очищали на колонке с 24 г силикагеля, элюируя хлороформом и метанолом, с получением соединения 7.4, которое используют на следующей стадии. (+esi)[M+H]⁺=463,4.

HCl-соль 6-амино-N-(4-(диэтилкарбамоил)фенил)хинолин-3-карбоксамид.

Стадия 4. 4 М водный раствор HCl (1 мл) добавляли к соединению 7.4, полученному на стадии 3, и обрабатывали ультразвуком в течение 20 мин. LCMS указывает на завершение реакции. Избыток реагента удаляли путем лиофилизации, а полученное твердое вещество промывали эфиром и сушили с получением желаемого продукта в виде желтого твердого вещества (18 мг, 25% с 2 стадий). (+esi)[M+H]⁺= 363,3 (-HCl). ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ=9,28 (s, 1H), 9,18 (s, 1H), 8,03 (d, J= 9,3 Гц, 1H), 7,91 (d, J= 8,5 Гц, 2H), 7,71 (dd, J= 2,1, 9,1 Гц, 1H), 7,45 (d, J=8,5 Гц, 2H), 7,33 (d, J= 2,3 Гц, 1H), 3,57 (br s, 2H), 3,37 (br s, 2H), 1,27 (br s, 3H), 1,18 (br s, 3H).

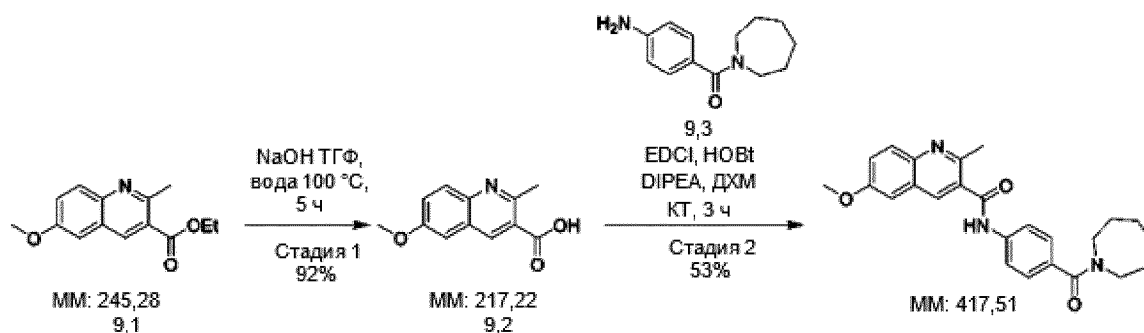
Схема 8. Схема синтеза соединения N-(4-(диэтилкарбамоил)фенил)-2-метилхинолин-3-карбоксамида



2-Метилхинолин-3-карбоновая кислота. Стадия 1. В герметичную пробирку загружали соединение-8.1 (100 мг, 0,465 ммоль) и гидроксид натрия (102 мг, 2,56 ммоль) в тетрагидрофуране (1 мл) и воде (1 мл) и перемешивали при 100°C в течение 4 часов. ТСХ указывала на полное превращение СМ в продукт. Затем тетрагидрофуран удаляли при пониженном давлении и неочищенный продукт разбавляли водой, промывали этилацетатом (2×5 мл). pH водного слоя доводили до 5 с помощью 10% раствора лимонной кислоты и затем экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали солевым раствором, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенное соединение-8.2 использовали для следующей стадии без дополнительной очистки.

N-(4-(Диэтилкарбамоил)фенил)-2-метилхинолин-3-карбоксамида. Стадия 2. К раствору соединения-8.2 (70,0 мг, 0,374 ммоль) в безводном дихлорметане (2,8 мл) добавляли соединение-2 (64,7 мг, 0,337 ммоль) с последующим добавлением EDCI (78,9 мг, 0,411 ммоль), HOBT (55,6 мг, 0,411 ммоль) и DIPEA (0,130 мл, 0,748 ммоль) при 20 °C, и полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. температура в течение 3 ч. ТСХ и ЖХ-МС не показали признаков образования какого-либо продукта. Поэтому добавляли NATU (213 мг, 0,561 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. ЖХ-МС показала только 6% превращение. После обычной обработки полученное неочищенное соединение очищали с использованием колоночной флеш-хроматографии с силикагелем на 12 г, элюируя MeOH:ДХМ (0-10%), и получали неочищенный целевой продукт. Этот неочищенный продукт снова очищали препаративной ВЭЖХ с получением чистого соединения в виде белого твердого вещества (6 мг, 3,5% с 2 стадий). (+esi)[M+H]⁺=362,2. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ=8,64 (s, 1H), 8,12-8,03 (m, 2H), 7,90 (t, J= 7,9 Гц, 1H), 7,85 (d, J= 8,3 Гц, 2H), 7,75-7,66 (m, 1H), 7,44 (d, J= 8,5 Гц, 2H), 3,57 (br s, 2H), 3,37 (br s, 2H), 2,89 (s, 3H), 1,27 (br s, 3H), 1,18 (br s, 3H).

Схема 9. Схема синтеза соединения N-(4-(азепан-1-карбонил)фенил)-6-метокси-2-метилхинолин-3-карбоксамида

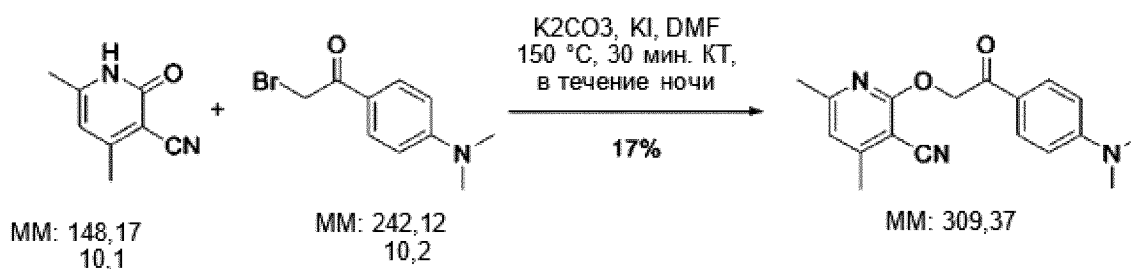


6-метокси-2-метилхинолин-3-карбоновая кислота. Стадия 1. В герметичную пробирку загружали **соединение-9.1** (200 мг, 0,815 ммоль) и гидроксид натрия (179 мг, 4,48 ммоль) в тетрагидрофуране (2,00 мл) и воде (2,00 мл) и перемешивали при 100°C в течение 5 часов. ТСХ указывала на полное превращение СМ в продукт. Затем удаляли ТГФ при пониженном давлении и неочищенный продукт разбавляли водой, промывали этилацетатом (2×5 мл). pH водного слоя доводили до 5 с помощью 10% раствора лимонной кислоты и затем экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали соевым раствором, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенное **соединение-9.2** (163 мг, 92%) использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

N-(4-(Азепан-1-карбонил)фенил)-6-метокси-2-метилхинолин-3-карбоксамид.

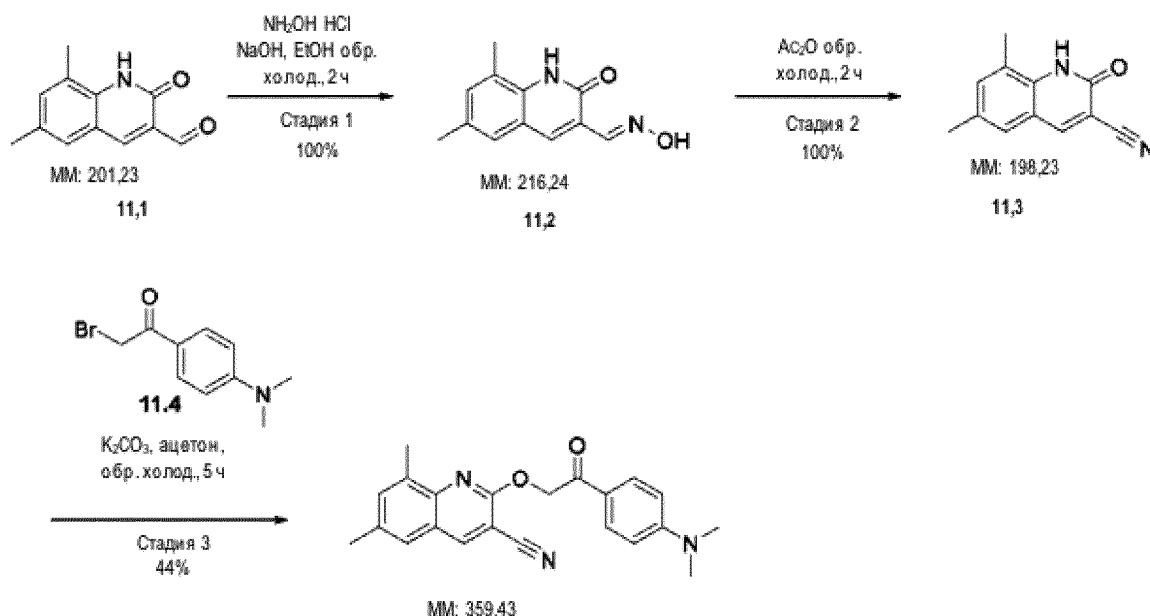
Стадия 2. К раствору **соединения-9.2** (50,0 мг, 0,230 ммоль) в безводном дихлорметане (2 мл) добавляли **соединение-9.3** (45,2 мг, 0,207 ммоль) с последующим добавлением EDCI (48,5 мг, 0,253 ммоль), HOBT (34,2 мг, 0,253 ммоль) и DIPEA (0,0802 мл, 0,460 ммоль) при 20°C, и полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном и промывали водой. Водный слой экстрагировали этилацетатом и объединенные органические слои сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и выпаривали. Полученное неочищенное **соединение** очищали с использованием колоночной флеш-хроматографии с силикагелем на 12 г с элюированием MeOH: ДХМ (от 0 до 10%), получали желаемый продукт в виде бледно-желтого твердого вещества (51 мг, 53%). (+esi)[M+H]⁺=418,2. 1H ЯМР (300 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ 8,14 (s, 1H), 8,01-7,90 (m, 1H), 7,68 (br d, J=8,2 Гц, 2H), 7,48-7,33 (m, 4H), 7,04 (d, J=2,9 Гц, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,68-3,58 (m, 2H), 3,40 (br s, 2H), 2,84 (s, 3H), 1,87-1,73 (m, 2H), 1,60 (br s, 6H).

Схема 10. Схема синтеза соединения 2-(2-(4-(диметиламино)фенил)-2-оксоэтокси)-4,6-диметилникотинитрила



2-(2-(4-(Диметиламино)фенил)-2-оксоэтокси)-4,6-диметилникотинонитрил. В высушенный пламенем флакон загружали соединение-**10.1** (200 мг, 1,35 ммоль) в безводном диметилформамиде (6 мл), добавляли карбонат калия (205 мг, 1,48 ммоль) и йодид калия (246 мг, 1,48 ммоль). Эту реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут, к вышеуказанной реакционной смеси добавляли соединение-**10.2** (327 мг, 1,35 ммоль) и перемешивали при 150°C в течение 30 минут и при комнатной температуре в течение ночи. ТСХ и ЖХ-МС показали полное превращение в продукт. Реакционную смесь выливали в воду (10 мл), экстрагировали этилацетатом (3×10 мл) и объединенные органические слои сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и выпаривали. Полученное неочищенное соединение очищали с использованием колоночной флеш-хроматографии с силикагелем на 12 г, элюировали гексаном в этилацетате (от 0 до 30%), необходимые фракции концентрировали, растирали с диэтиловым эфиром. Наконец, соединение очищали препаративной ВЭЖХ с получением желаемого продукта (70 мг, 17%). (+esi)[M+H]⁺=310,2. ¹H ЯМР (300 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ 7,88 (d, J=8,79 Гц, 2 H) 6,64–6,71 (m, 3 H) 5,59–5,65 (m, 2 H) 3,07 (s, 6 H) 2,45 (s, 3 H) 2,30 (s, 3 H).

Схема 11. Схема синтеза соединения 2-(2-(4-(диметиламино)фенил)-2-оксоэтокси)-6,8-диметилхинолин-3-карбонитрила



(Е)-6,8-Диметил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбальдегидоксим. Стадия 1. К раствору гидрохлорида гидроксиламина (50 мг, 0,72 ммоль) в воде (0,15 мл) добавляли 4 М водный раствор гидроксида натрия (0,2 мл) при 10°C, перемешивали в течение 10 мин. при комнатной температуре и добавляли в раствор соединения-**11.1** (50 мг, 0,25 ммоль) в этаноле (1,16 мл) при комнатной температуре и полученную реакционную смесь нагревали до 90°C и перемешивали в течение 3 часов. После завершения реакции (подтверждено ТСХ; 5% MeOH:ДХМ; $R_f \sim 0,2$) реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и выливали в холодную воду. pH раствора доводили до 2, используя 4 н. водный раствор

хлористоводородной кислоты. Отделенное твердое вещество отфильтровывали, промывали водой и сушили при пониженном давлении с получением соединения-11.2 (54 мг, 100%).

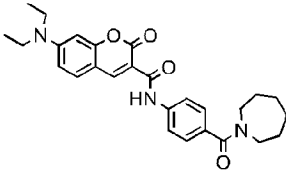
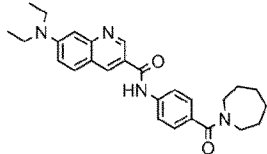
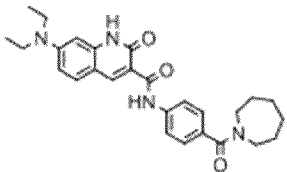
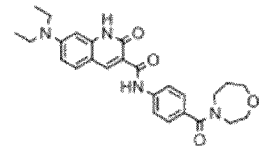
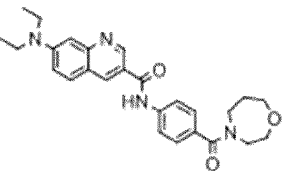
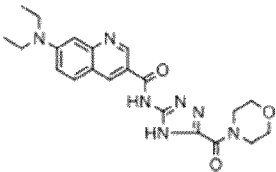
6,8-Диметил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбонитрил. Стадия 2. Уксусный ангидрид (1,8 г, 18 ммоль) добавляли к соединению-11.2 (54 мг, 0,25 ммоль), нагревали до 140°C и перемешивали в течение 3 часов. После завершения реакции (подтверждено ТСХ; 5% MeOH:ДХМ) реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли водой. Затем смесь подщелачивали до pH=10, используя 4 н. водный раствор гидроксида натрия. Отделенное твердое вещество отфильтровывали, промывали водой и сушили при пониженном давлении с получением соединения-11.3 (50 мг; количественный выход).

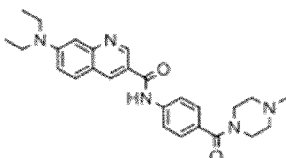
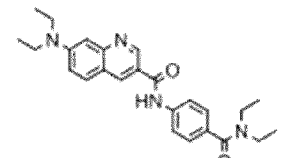
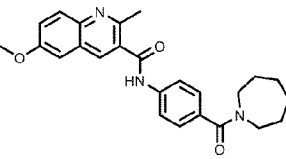
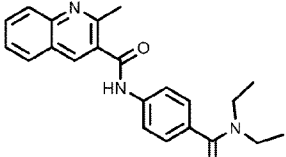
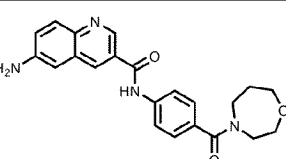
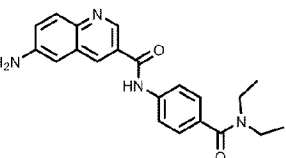
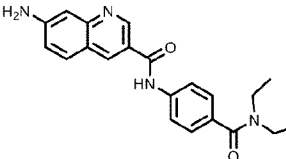
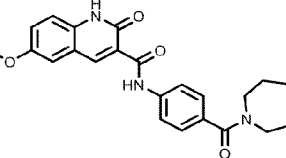
2-(2-(4-(Диметиламино)фенил)-2-оксоэтокси)-6,8-диметилхинолин-3-карбонитрил. Стадия 3. В высушенный пламенем флакон загружали соединение-11.3 (50 мг, 0,25 ммоль) в безводном диметилформамиде (1 мл), добавляли карбонат калия (38 мг, 0,27 ммоль) и йодид калия (42 мг, 0,27 ммоль). Эту реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут с последующим добавлением соединения-11.4 (60 мг, 0,25 ммоль) к вышеуказанной реакционной смеси и перемешивали при 150°C в течение 30 минут и при комнатной температуре в течение ночи. ТСХ и ЖХ-МС показали полное превращение в продукт. Реакционную смесь выливали в воду (5 мл), экстрагировали этилацетатом (3×10 мл) и объединенные органические слои сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и выпаривали. Полученное неочищенное соединение очищали с использованием колоночной флеш-хроматографии с силикагелем на 12 г, элюировали гексаном в этилацетате (от 0 до 30%), необходимые фракции концентрировали, растирали с диэтиловым эфиром. Наконец, соединение очищали препаративной ВЭЖХ с получением желаемого продукта в виде твердого вещества (40 мг, 44%), (+esi)[M+H]⁺=360,2, ¹H ЯМР (300 МГц, CD₂Cl₂) δ 8,28 (s, 1H), 7,87-7,83 (m, 2H), 7,33-7,31 (m, 2H), 6,75-6,72 (m, 2H), 5,63 (s, 2H), 2,99 (s, 6H), 2,34 (s, 3H), 2,28 (s, 3H).

Повышение уровня белка саркоспана in vitro

Соединения по изобретению анализировали на повышение уровней белка SSPN по сравнению с носителем (кратное изменение по сравнению с носителем) с помощью анализа SSPN-HiBiT, описанного выше (*p<0,05).

Таблица 1

Структура	Молекулярная масса	SSPN-HiBiT, кратность изменения по сравнению с носителем
	461,6	2,29*
	444,6	1,62*
	460,6	1,49*
	462,5	1,81*
	446,5	1,3*
	423,5	1,34*

	445,6	1,47*
	418,5	1,75*
	417,21	1,4*
	361,18	1,08*
	390,17	1,09*
	362,17	1,17*
	362,17	1,36*
	421,16	2,4*

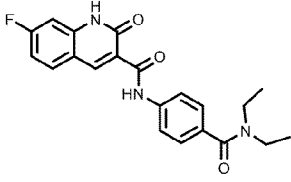
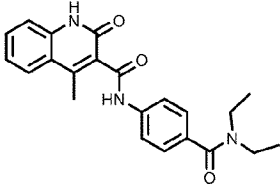
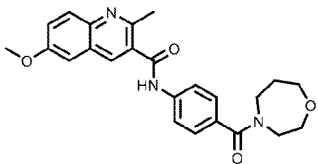
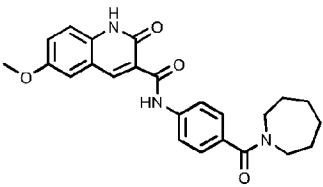
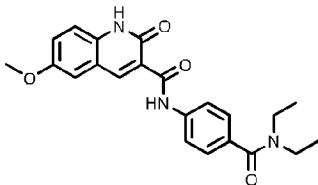
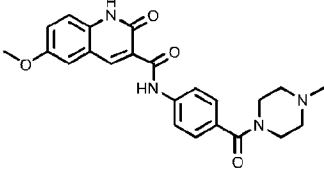
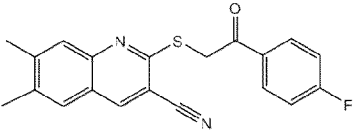
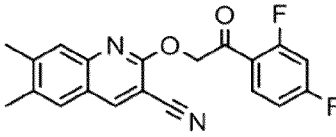
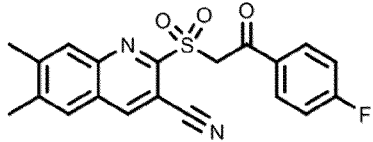
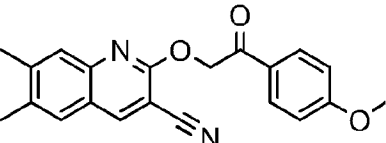
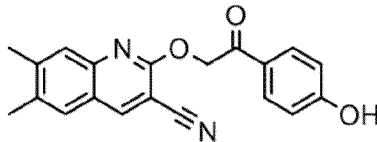
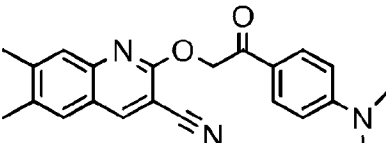
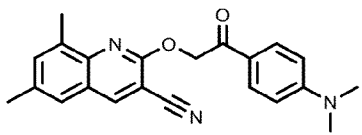
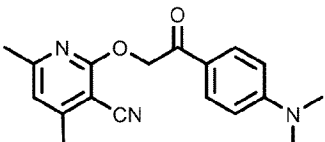
	381,15	1,45*
	377,17	1,21*
	419,18	1,22*
	419,18	1,03
	393,17	1,51*
	420,18	1,46*

Таблица 2

Структура	Молекулярная масса	SSPN-HiBiT, кратность изменения по сравнению с носителем
-----------	--------------------	--

	350,4	1,48*
	352,1	1,22*
	382,08	1,23*
	364,4	1,27*
	332,4	1,21
	359,4	1,04*
	359,16	1,3*
	309,15	1,09*

Включение посредством ссылки

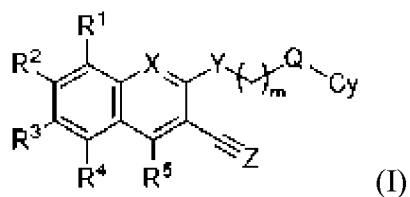
Все публикации и патенты, упомянутые в данном документе, настоящим полностью включены посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или патент были специально и отдельно указаны для включения посредством ссылки. В случае конфликта настоящая заявка, включая любые приведенные в данном документе определения, будет иметь преимущественную силу.

Эквиваленты

Хотя обсуждались конкретные варианты осуществления объекта изобретения, приведенное выше описание является иллюстративным, а не ограничительным. Многие варианты изобретения станут очевидными для специалистов в данной области техники после ознакомления с этим описанием и приведенной ниже формулой изобретения. Полный объем изобретения должен определяться ссылками на пункты формулы изобретения вместе с их полным объемом эквивалентов и описанием вместе с такими вариантами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, представленное формулой (I), или его фармацевтически приемлемая соль:



где

X представляет собой CR⁷ или N;

Y представляет собой S, O или SO₂;

Z представляет собой N или CR⁶;

каждый из R¹, R², R³, R⁴, R⁵ и R⁷ независимо представляет собой H, алкил, алкокси, галоген, нитрил, amino или aminoалкил;

R⁶ представляет собой H или алкил;

Q представляет собой C=O, SO или SO₂;

Cy представляет собой арил или гетероарил; и

m равно 1-3.

2. Соединение по п. 1, где X представляет собой N.

3. Соединение по п. 1 или п. 2, где Y представляет собой O.

4. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где Z представляет собой N.

5. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где Cy представляет собой арил.

6. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где Cy замещен aminoалкилом, галогеном, алкокси или OH.

7. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где каждый из R¹, R², R³, R⁴ и R⁵ независимо представляет собой H или алкил.

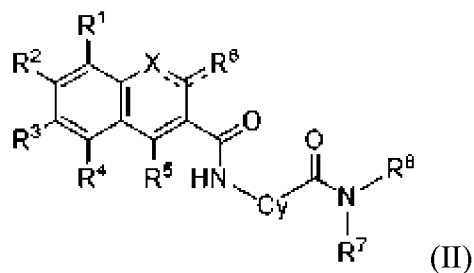
8. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где R¹, R⁴, R⁵ и R⁷ представляют собой H.

9. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где R² и R³ представляют собой метил.

10. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где m равно 1.

11. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где Q представляет собой C=O.

12. Соединение, представленное формулой (II), или его фармацевтически приемлемая соль:



где

X представляет собой O, N или NR⁹;

каждый из R¹, R², R³, R⁴ и R⁵ независимо представляет собой H, алкил, алкокси, галоген, нитрил, амино или аминоалкил;

R⁶ представляет собой H, =O или алкил;

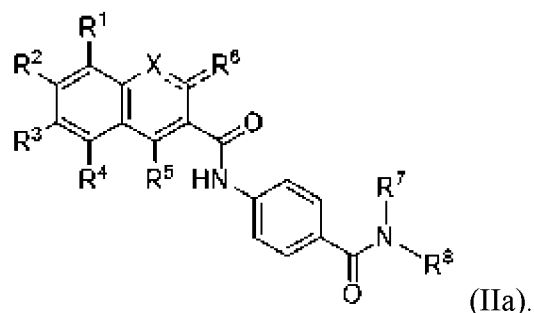
Su представляет собой арил или гетероарил;

каждый из R⁷ и R⁸ независимо представляет собой H или алкил, или вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют гетероцикл; и

R⁹ представляет собой H или алкил.

13. Соединение по п. 12, где Su представляет собой арил.

14. Соединение по п. 12 или п. 13, где соединение представлено формулой (IIa):

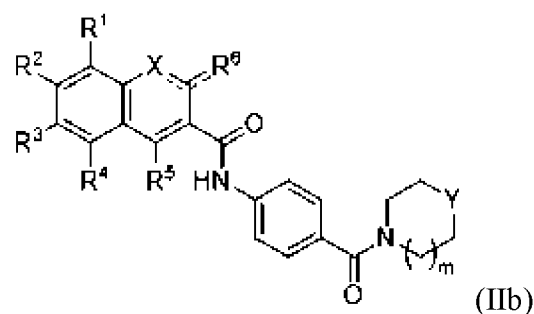


15. Соединение по любому из пп. 12-14, где X представляет собой N.

16. Соединение по любому из пп. 12-15, где R¹, R⁴ и R⁵ представляют собой H.

17. Соединение по любому из пп. 12-16, где R⁷ и R⁸ взяты вместе с образованием гетероцикла.

18. Соединение по любому из пп. 12-17, где соединение представлено формулой (IIb):



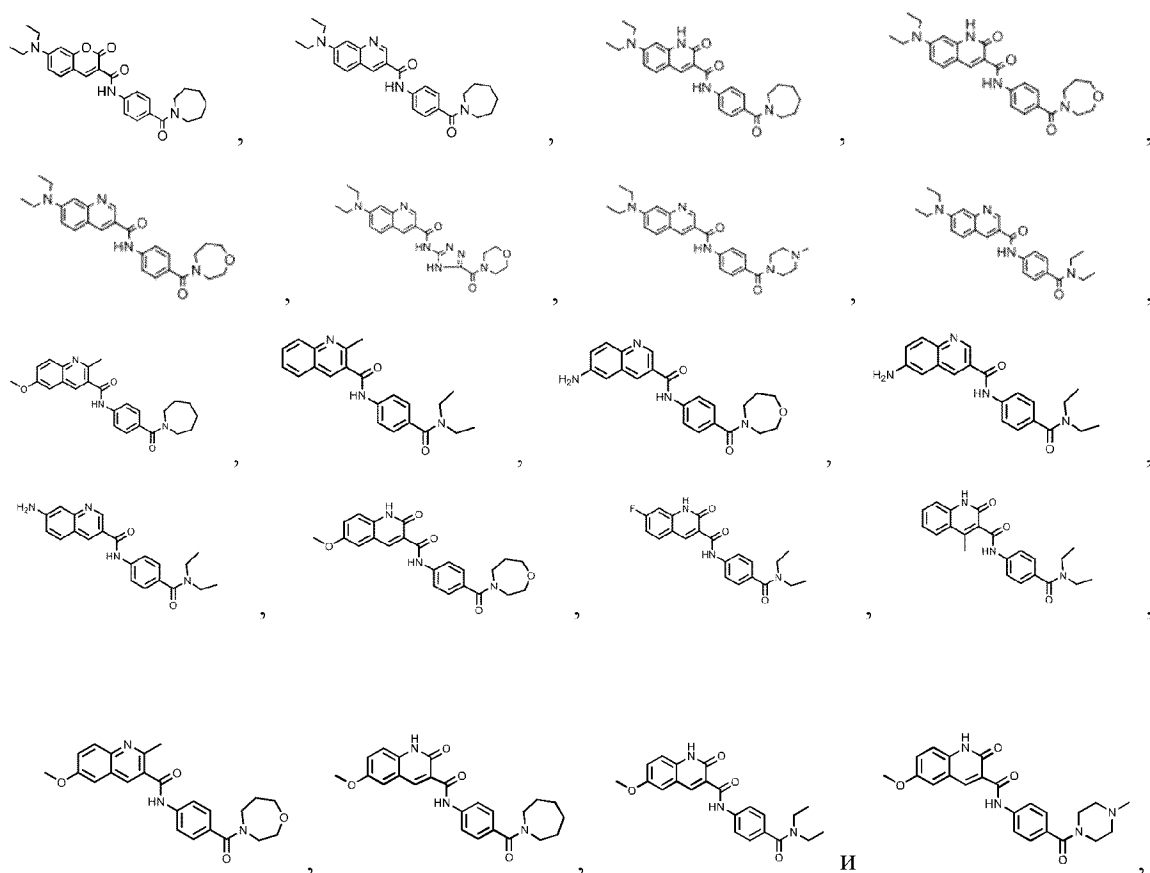
где

Y представляет собой O или NR¹⁰,

R¹⁰ представляет собой H, алкил или ацил; и

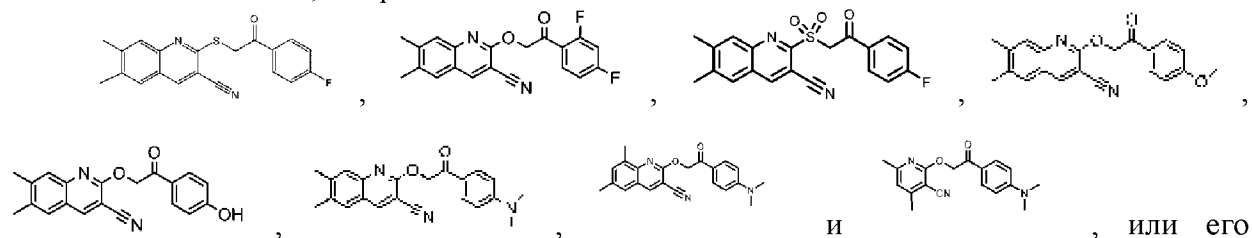
m равно 1 или 2.

19. Соединение, выбранное из:



или его фармацевтически приемлемая соль.

20. Соединение, выбранное из:



фармацевтически приемлемая соль.

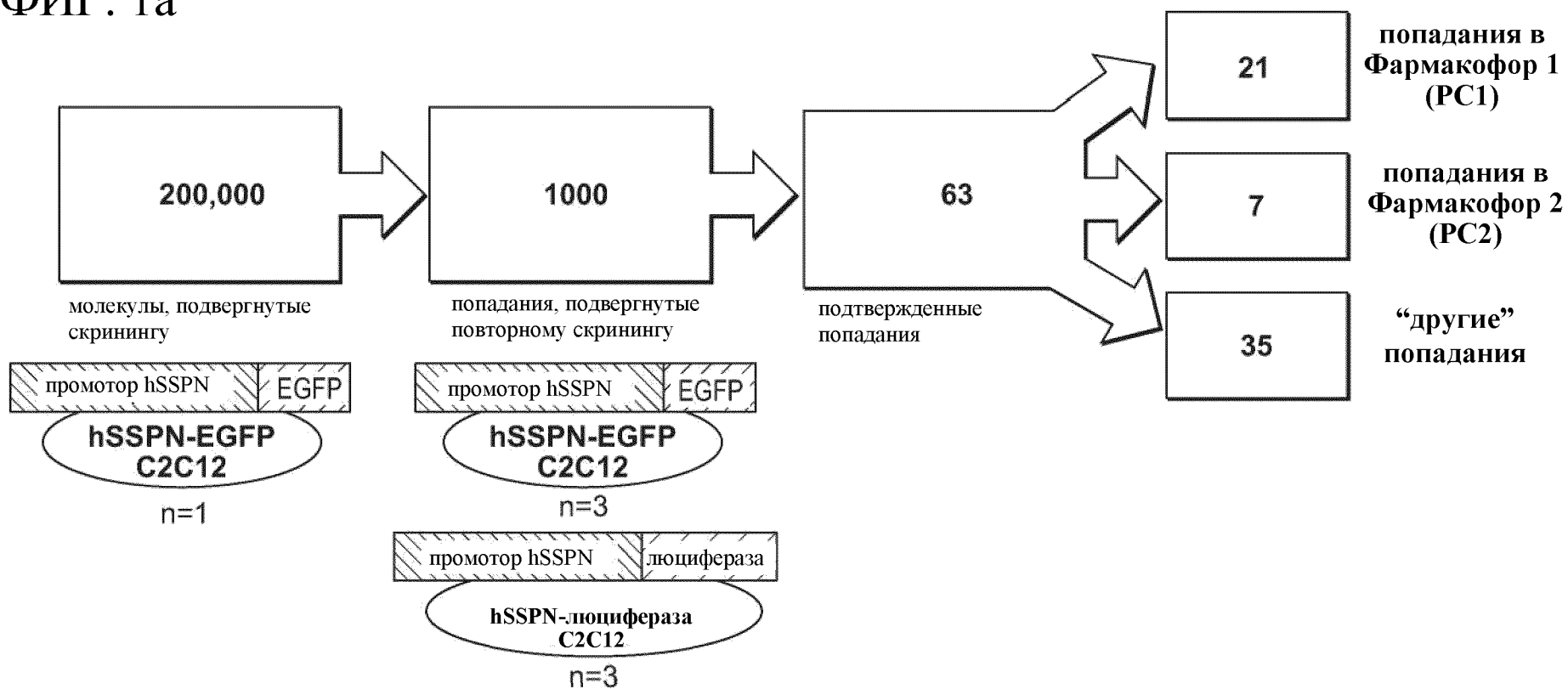
21. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из предыдущих пунктов и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

22. Способ лечения или предотвращения заболевания, связанного с дисфункцией комплекса, связанного с дистрофином, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту соединения по любому из предыдущих пунктов.

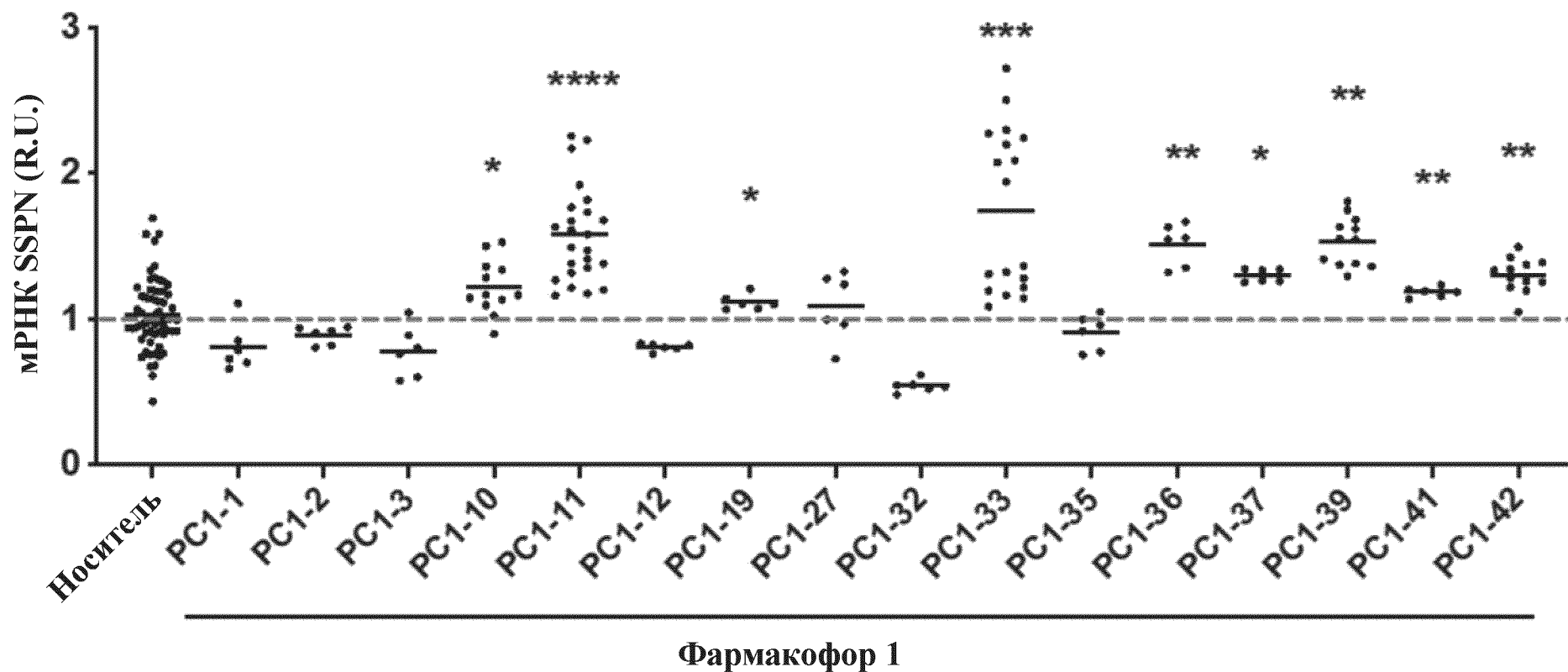
23. Способ по п. 22, при котором заболевание, связанное с дисфункцией комплекса, связанного с дистрофином, представляет собой мышечную дистрофию.

По доверенности

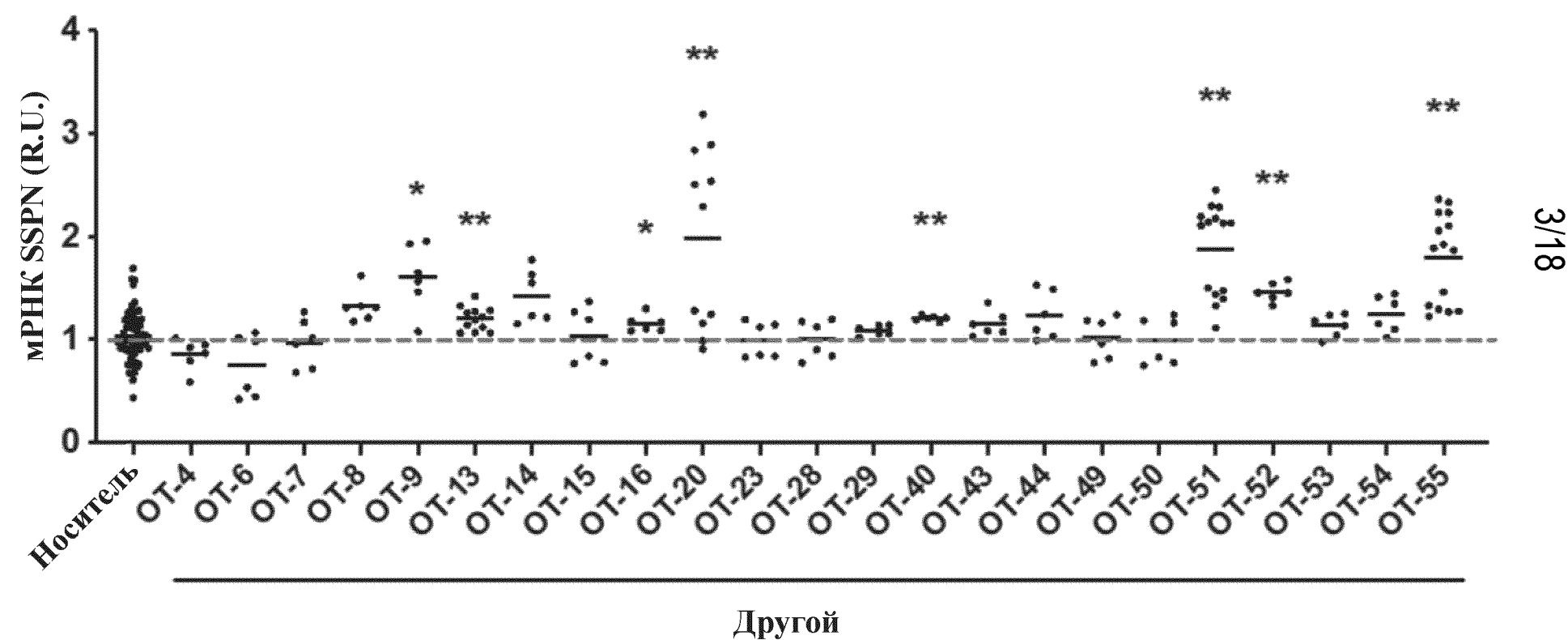
ФИГ. 1a



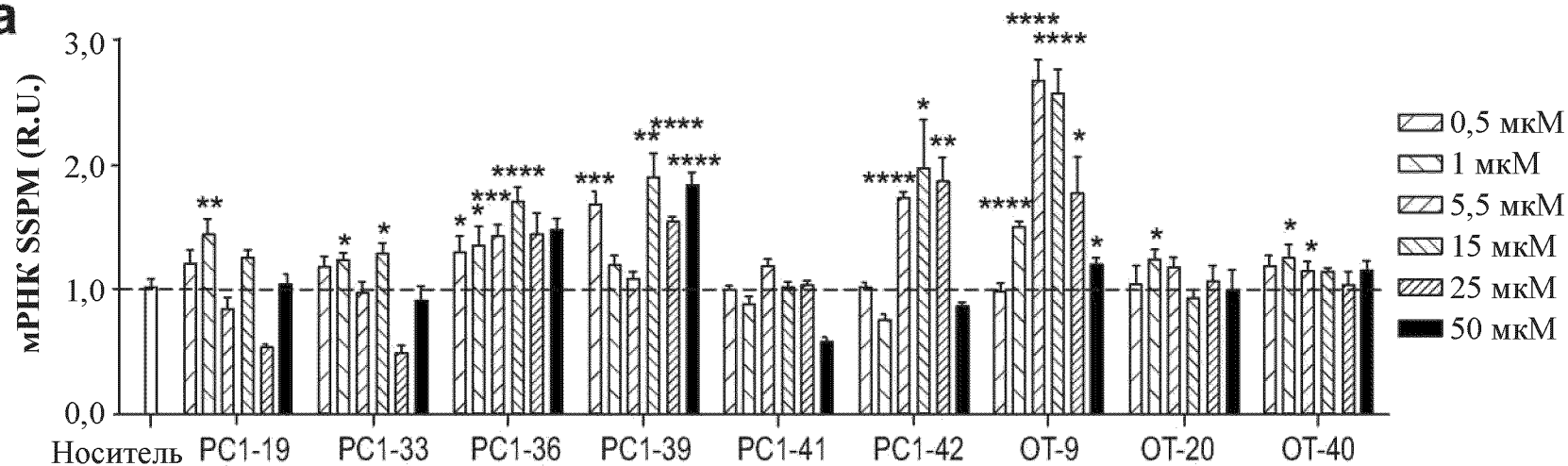
ФИГ. 1b



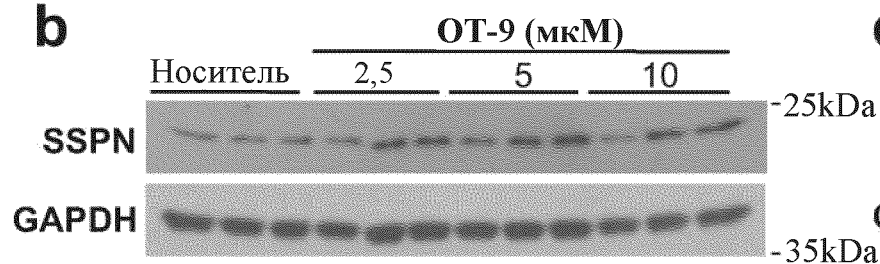
ФИГ. 1с



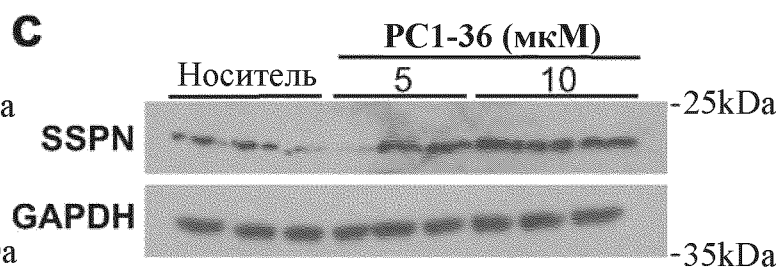
ФИГ. 2 **a**



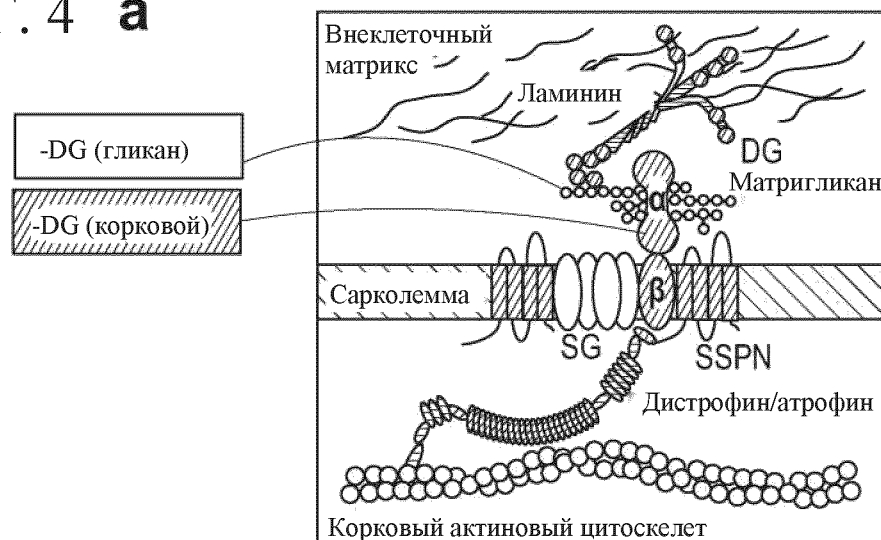
b



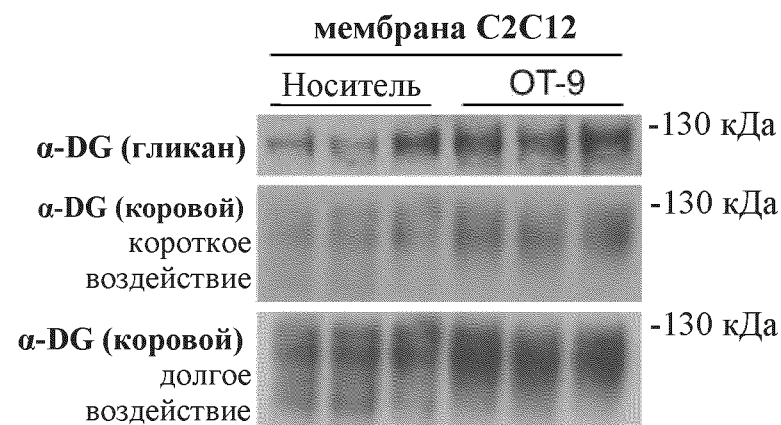
c



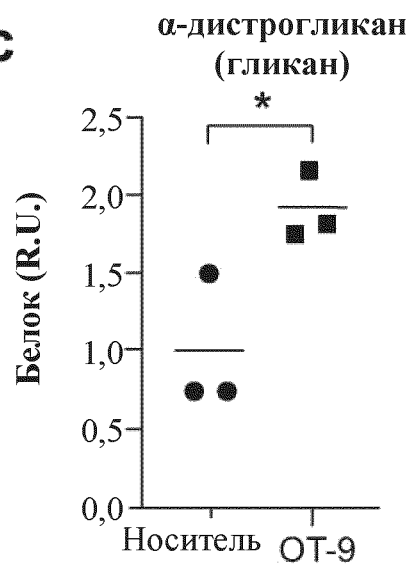
ФИГ. 4 **a**



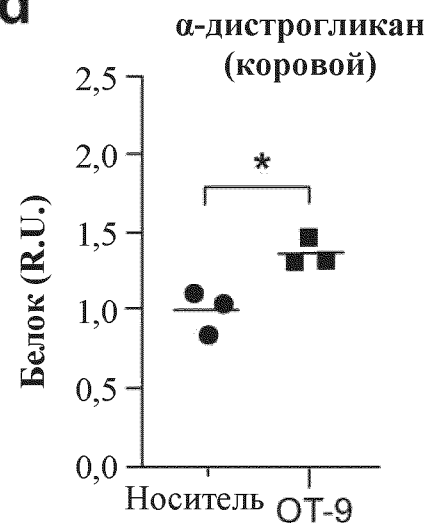
b



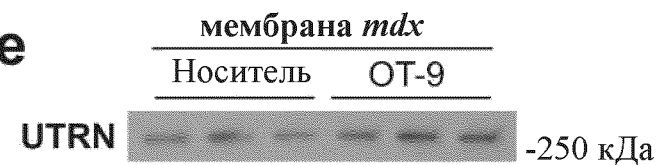
c



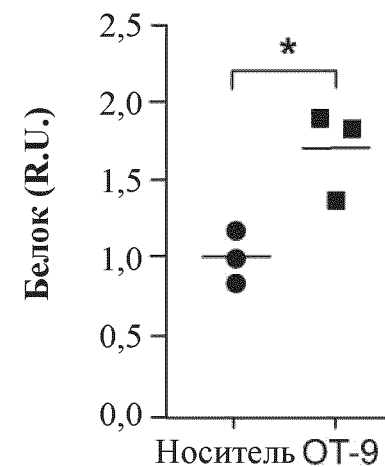
d



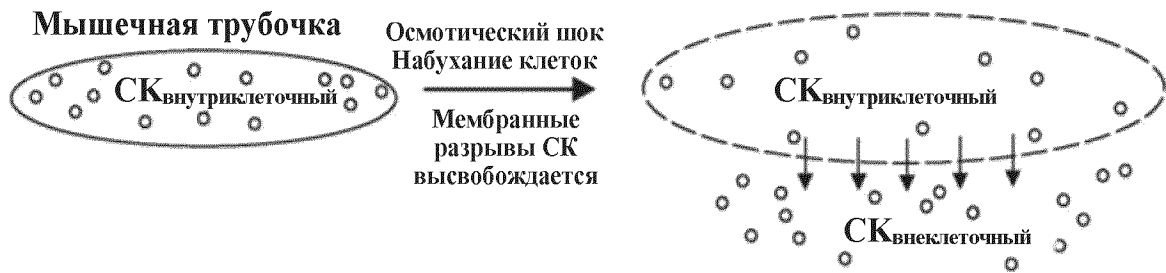
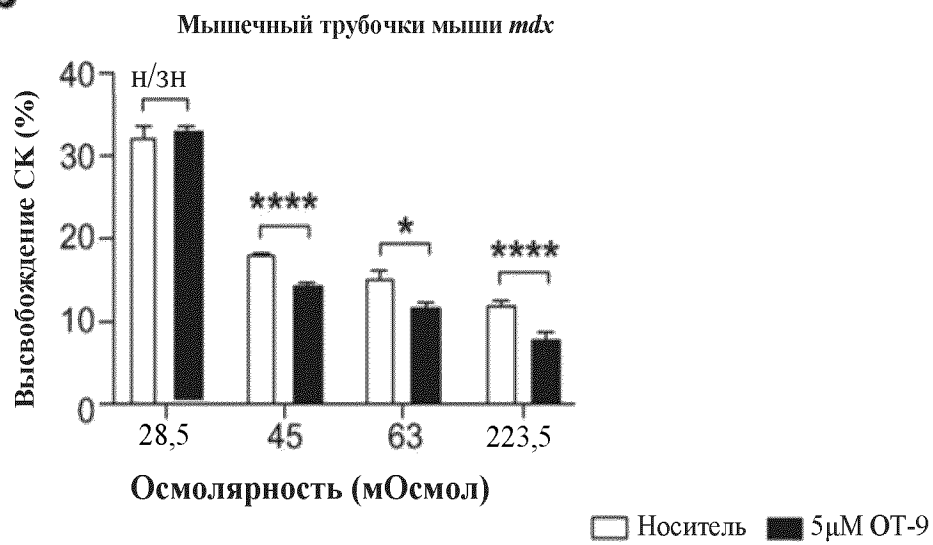
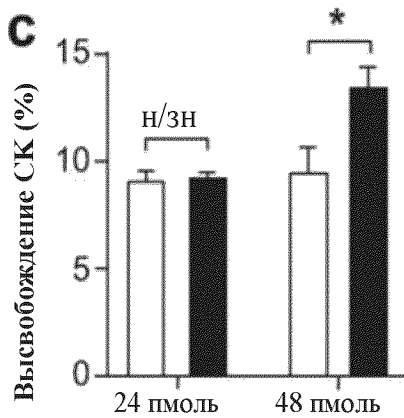
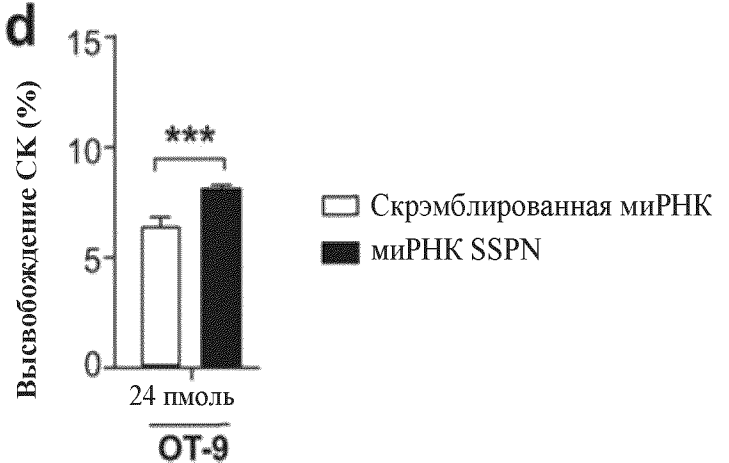
e



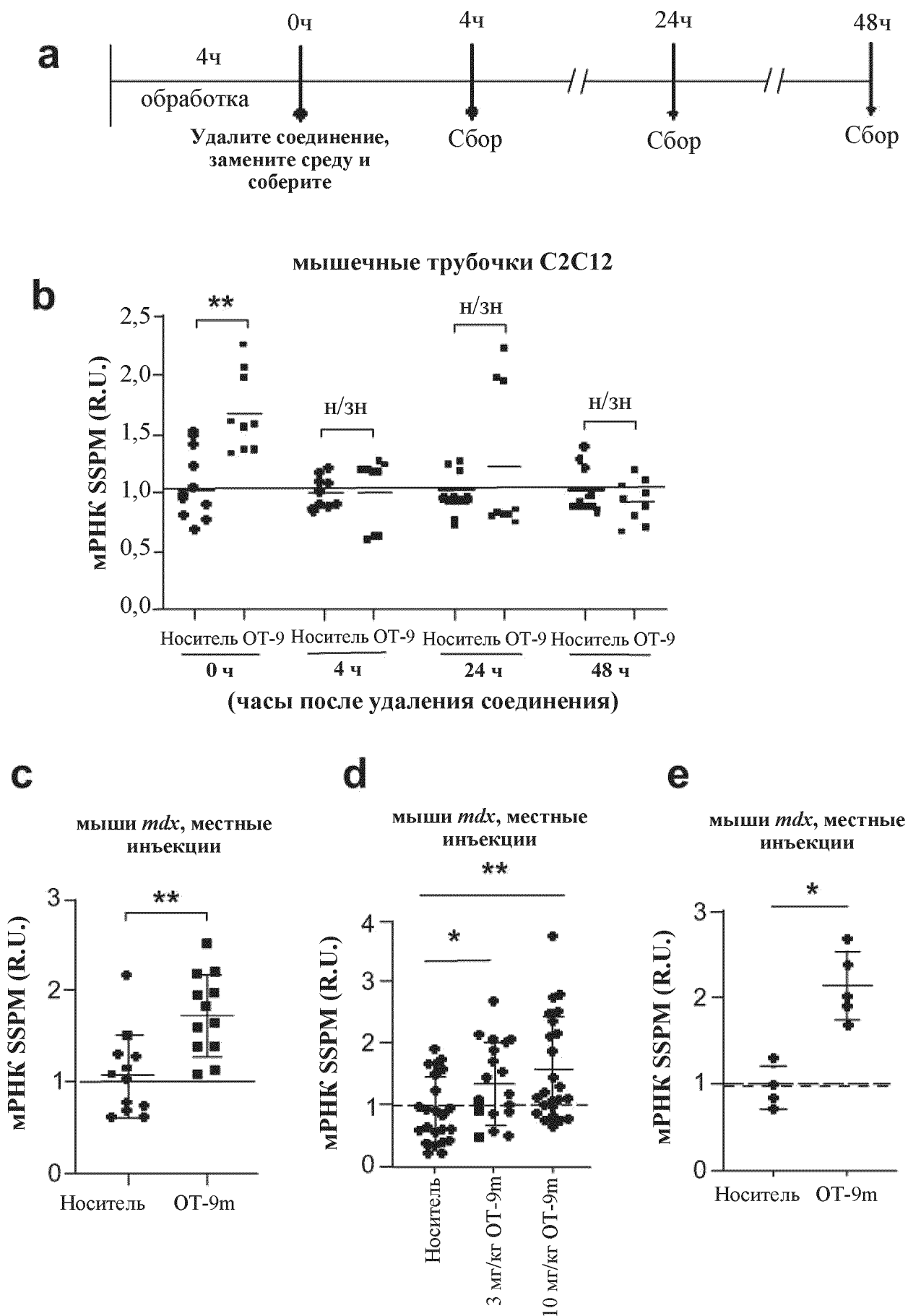
f



ФИГ. 5

a**b****c****d**

ФИГ. 6



ФИГ. 7

Планшет №	SSMD*	Планшет №	SSMD*	Планшет №	SSMD*	Планшет №	SSMD*	Планшет №	SSMD*	Планшет №	SSMD*	Планшет №	SSMD*
1	1,1	77	2,16	153	1,12	229	1,34	305	1,52	381	1,71	457	2,16
2	1	78	1,2	154	207	230	1,31	306	1,47	382	2,28	458	1,6
3	1	79	1,01	155	1,34	231	1	307	1,81	383	1,79	459	1,62
4	1,01	80	1,33	156	2	232	1,09	308	2,74	384	2,59	460	1,98
5	1,85	81	1,23	157	2,37	233	1,7	309	1,68	385	2,59	461	2,5
6	1,04	82	1,53	158	2,16	234	1,37	310	1,34	386	2,19	462	1,75
7	1,68	83	1,24	159	2,15	235	1,97	311	1,97	387	1,83	463	2,37
8	1,21	84	1,19	160	1,39	236	1,24	312	1,68	388	2,02	464	1,98
9	1,54	85	1,37	161	1,63	237	1,35	313	1,68	389	2,66	465	1,93
10	1,28	86	1,24	162	1,23	238	1,07	314	1,88	390	2,03	466	2,69
11	1,11	87	1,14	163	1,13	239	1,08	315	203	391	2,15	467	1,67
12	1	88	1,1	164	1,51	240	1,08	316	224	392	2,41	468	267
13	1,49	89	1	165	1,18	241	1,03	317	228	393	3,07	469	236
14	1	90	1,15	166	1,17	242	1,04	318	1,73	394	3,1	470	236
15	1,17	91	1,14	167	2,05	243	1,1	319	1,56	395	222	471	1,66
16	1,66	92	1,05	168	2,55	244	1	320	2,68	396	224	472	1,34
17	1,22	93	1,33	169	1,25	245	1,1	321	2,41	397	3,27	473	248
18	1	94	1,67	170	221	246	1,55	322	1,73	398	1,96	474	211
19	1,53	95	1,42	171	279	247	1,07	323	3,3	399	263	475	278
20	1	96	1,05	172	1,53	248	1,03	324	2,42	400	1,5	476	3,62
21	1,14	97	1,49	173	263	249	1,8	325	2,01	401	2,75	477	241
22	1,32	98	1,19	174	1,85	250	1,08	326	1,77	402	1,31	478	3,22
23	1,22	99	1,05	175	262	252	1,59	327	2,42	403	232	479	1,05
24	1	100	1,25	176	1,82	252	1,65	328	228	404	281	480	216
25	1,08	101	1,53	177	233	253	1,08	329	205	405	247	481	1
26	1,5	102	1,12	178	216	254	2,05	330	3,35	406	224	482	1,26

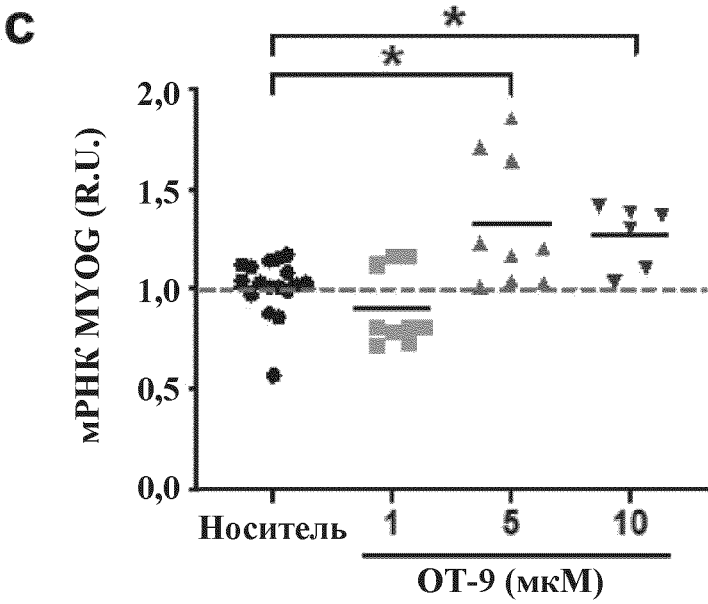
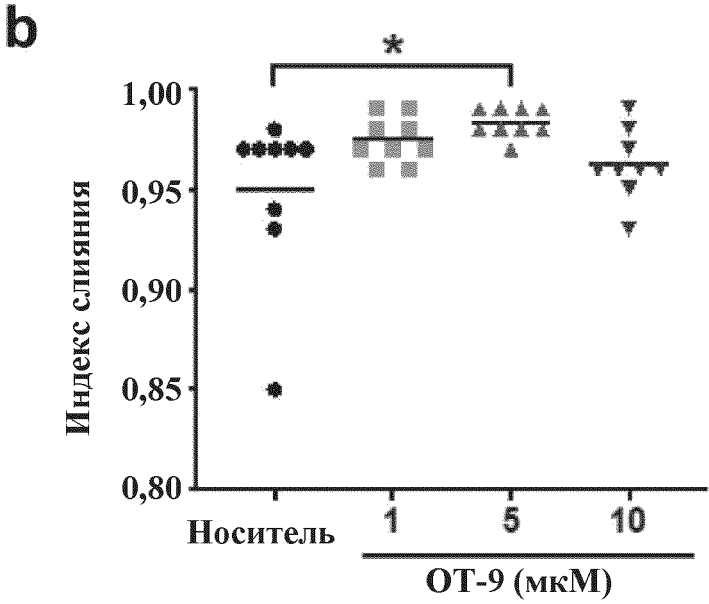
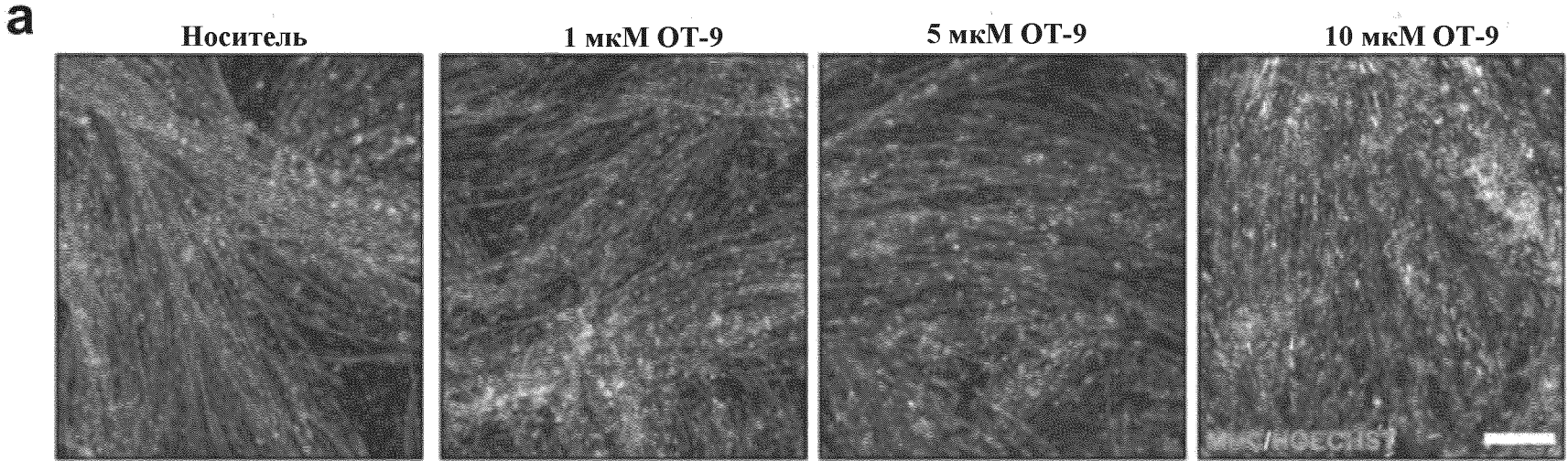
ФИГ. 7 (прод.)

27	1,17	103	1,29	179	1,68	255	1,56	331	1,53	407	283	483	1,1
28	1	104	1,72	180	2,38	256	1,18	332	1,48	408	271	484	1,25
29	1,36	105	1,42	181	1,49	257	1,54	333	1,51	409	1,09	485	1,67
30	223	106	1,81	182	1,77	258	1,54	334	1,83	410	1,03	486	1,4
31	279	107	1,42	183	2,03	259	1	335	1,07	411	1	487	1,4
32	1,68	108	1,74	184	2,56	260	1,04	336	238	412	1,01	488	1
33	1,01	109	1,27	185	2,95	261	1,04	337	1,62	413	1,33	489	1,36
34	2,37	110	1,01	186	1,28	262	1,14	338	1,62	414	1,35	490	1,27
35	1,65	111	1,62	187	1,62	263	1,26	339	2,31	415	1,65	491	1,07
36	203	112	1,03	188	1,11	264	1,44	340	1,2	416	1,98	492	1,46
37	1,85	113	1,46	189	1,02	265	1,53	341	1,58	417	1,66	493	1,1
38	1,32	114	1	190	1,38	266	1,82	342	1,77	418	1,75	494	1,56
39	1,49	115	1,4	191	1,43	267	1,4	343	1	419	1,62	495	1,26
40	1,49	116	1,22	192	1,61	268	1,47	344	1,17	420	1,7	496	1,54
41	221	117	1,32	193	2,07	269	1,5	345	1,12	421	21	497	1,81
42	221	118	1,05	194	1,05	270	1,86	346	1,37	422	209	498	1,3
43	1,46	119	1,59	195	1,31	271	1,84	347	1,85	423	1,77	499	1,5
44	1,38	120	1,12	196	1,03	272	1,41	348	1,49	424	1,6	500	1,91
45	1	121	1,86	197	1,13	273	1,65	349	1,73	425	1,5	501	1,44
46	1	122	1,68	198	1,4	274	2,36	350	1,58	426	1,4	502	1,66
47	1,02	123	1	199	1,21	275	2,13	351	1,92	427	1,45	503	201
48	1,17	124	2,24	200	1,42	276	2,38	352	2,32	428	1,89	504	1,45
49	1	125	1,61	201	1	277	1,22	353	211	429	1,7	505	1,75
50	1,18	126	1,27	202	1,13	278	1,73	354	1,77	430	1,57	506	1,64
51	1	127	1,04	203	1,19	279	2,36	355	219	431	1,56	507	2,1
52	1,01	128	1,39	204	1,44	280	2,31	356	270	431	1,88	508	1,9
53	1,39	129	1,98	205	1,43	281	225	357	1,55	433	1,88	509	2,13

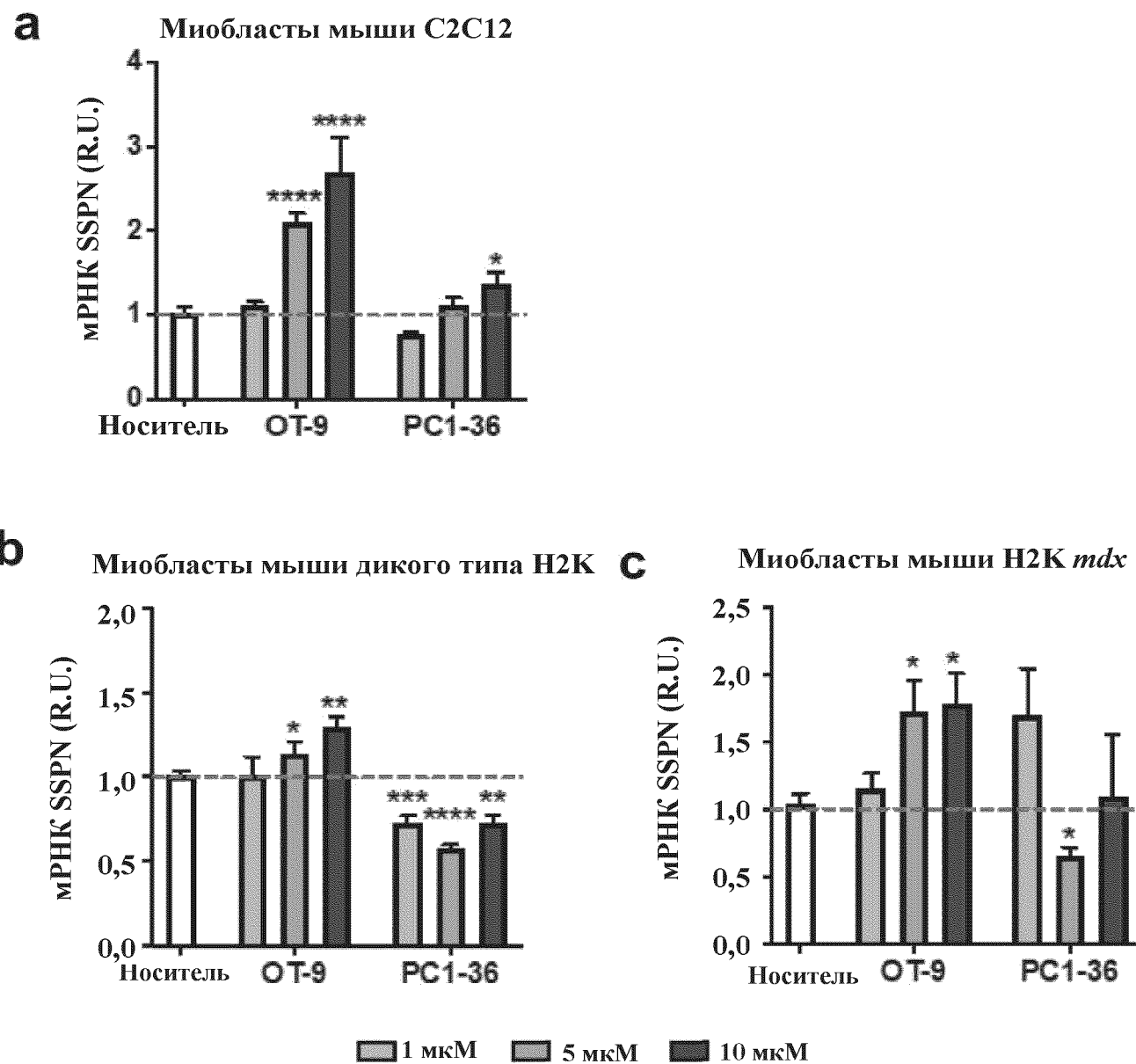
ФИГ. 7 (прод.)

54	1,4	130	1	206	1,52	282	259	358	1,38	434	1,82	510	1,72
55	1,10	131	1,46	207	1,03	283	248	359	1,49	435	21	511	268
56	1,08	132	1,23	208	1,2	284	223	360	1,49	436	1,8	512	1,37
57	1	133	1,2	209	1,25	285	22	361	1,59	437	1,53	513	1,09
58	1,52	134	1,68	210	1,01	286	1,96	362	1,69	438	213	514	1,63
59	1	135	1,36	211	1,06	287	202	363	1,47	439	1,48	515	1,05
60	1,48	136	24	212	1,17	288	248	364	1,65	440	211	516	1
61	3,02	137	1,01	213	1,33	289	28	365	245	441	1,43	517	1,23
62	1,29	138	1,18	214	1,63	290	25	366	1,95	442	236	518	1,22
63	1,24	139	1,09	215	1,27	291	294	367	1,69	443	1,86	519	1,02
64	1,02	140	1,64	216	1	292	241	368	1,8	444	3,29	520	1
65	1,04	141	1,5	217	1,81	293	256	369	22	445	1,23	521	1,33
66	1	142	1	218	1,35	294	231	370	207	446	1,19	522	204
67	1,29	143	1	219	1,45	295	1,35	371	262	447	1,59	523	1,08
68	1,12	144	1,09	220	1,72	296	1,33	372	24	448	1,73	524	216
69	1	145	1,06	221	1,97	297	1,02	373	277	449	1,93	525	1,76
70	1,38	146	1,63	222	1,2	298	1,78	374	1,78	450	1,32	526	1,04
71	208	147	1,28	223	1,49	299	1,19	375	1,71	451	1,58	527	1,88
72	1,87	148	1,34	224	1,23	300	1,77	376	213	452	273	528	1,64
73	1,3	149	1,84	225	1,41	301	1,92	377	1,49	453	228	529	1,74
74	1,11	150	1,3	226	1,33	302	1,73	378	1,49	454	1,78	530	242
75	1,32	151	1,08	227	1,38	303	1,93	379	224	455	1,73	531	1,41
76	2,14	152	1,03	228	1,33	304	1,71	380	1,87	456	1,57	532	1,29

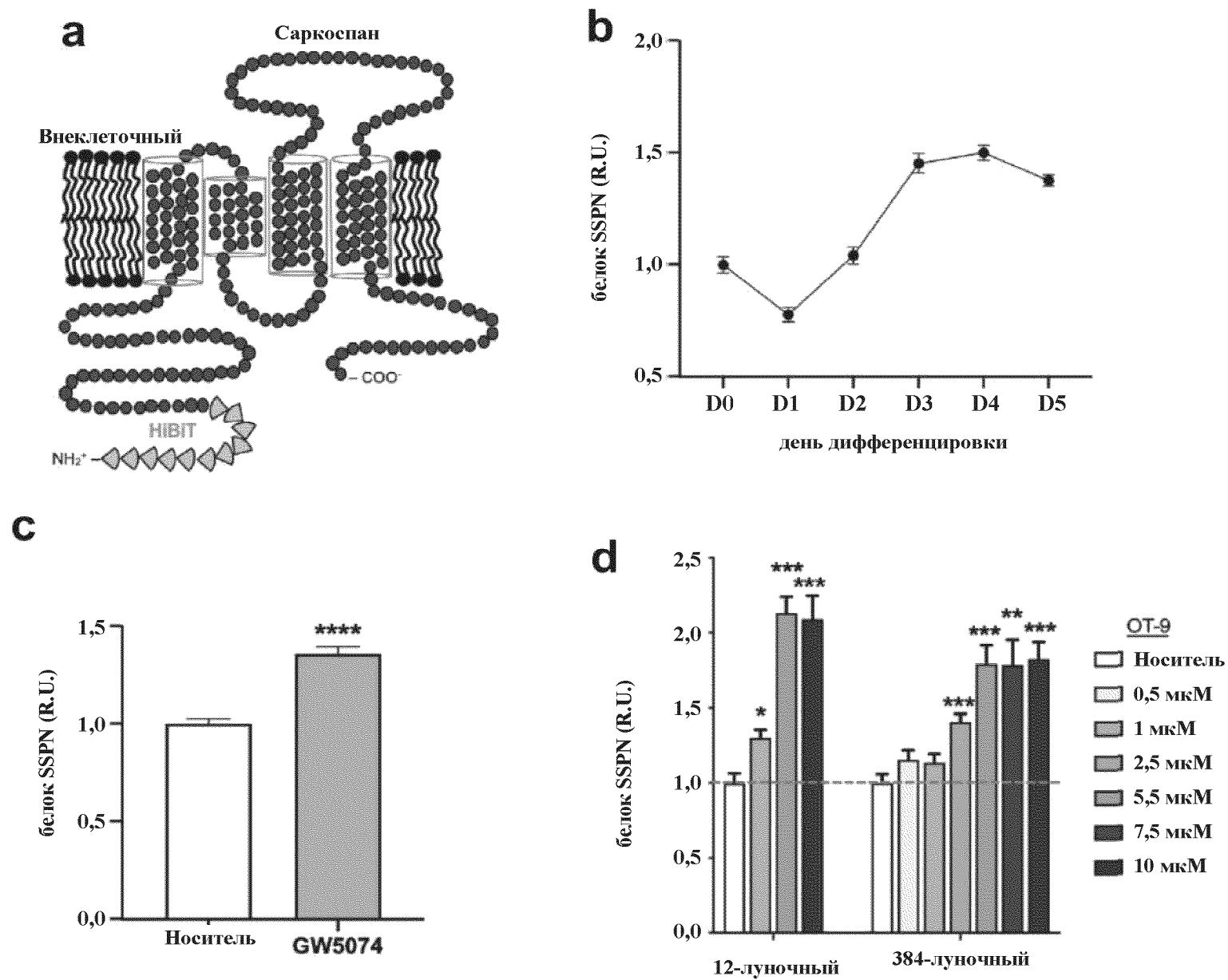
ФИГ. 8



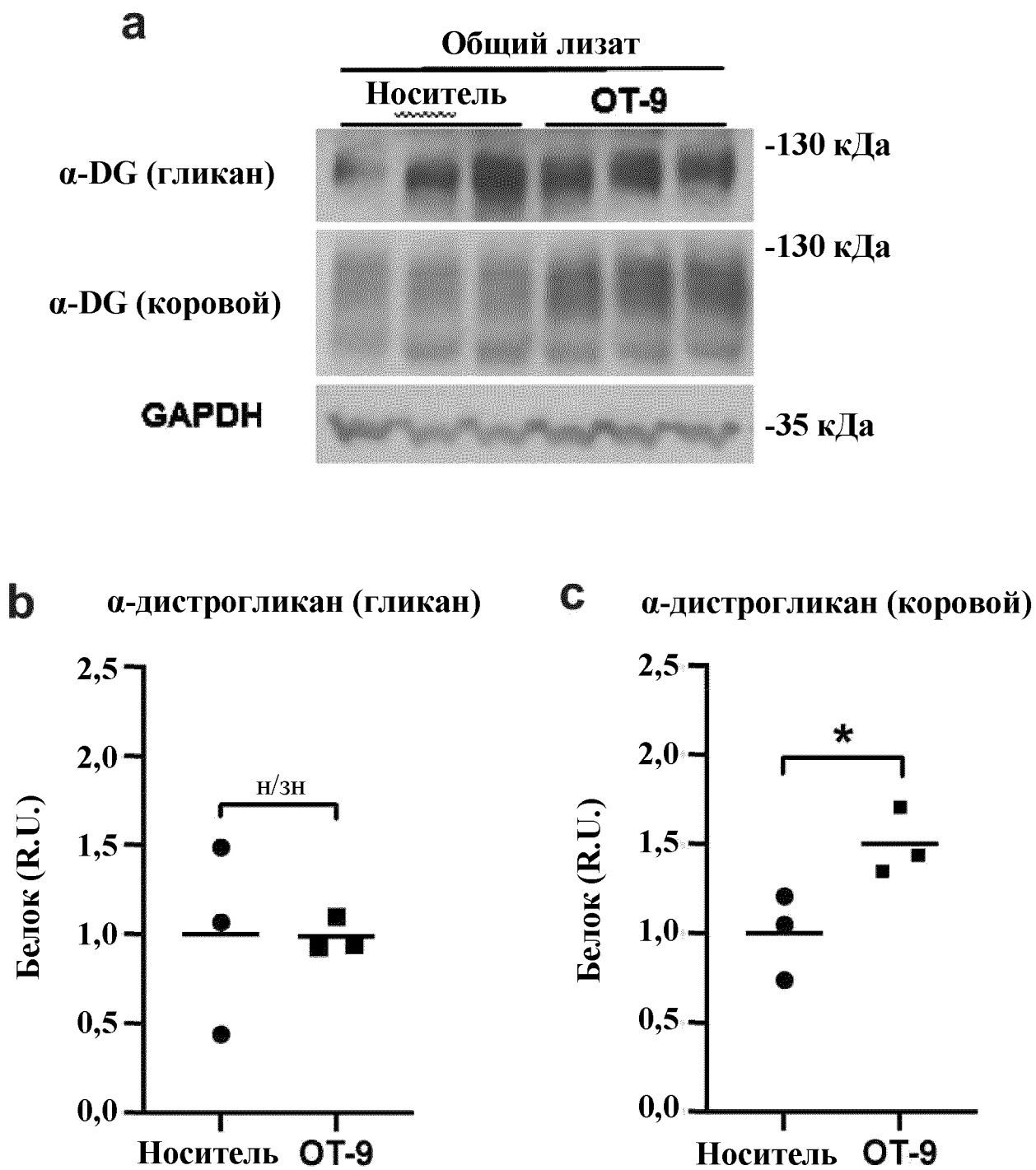
ФИГ. 9



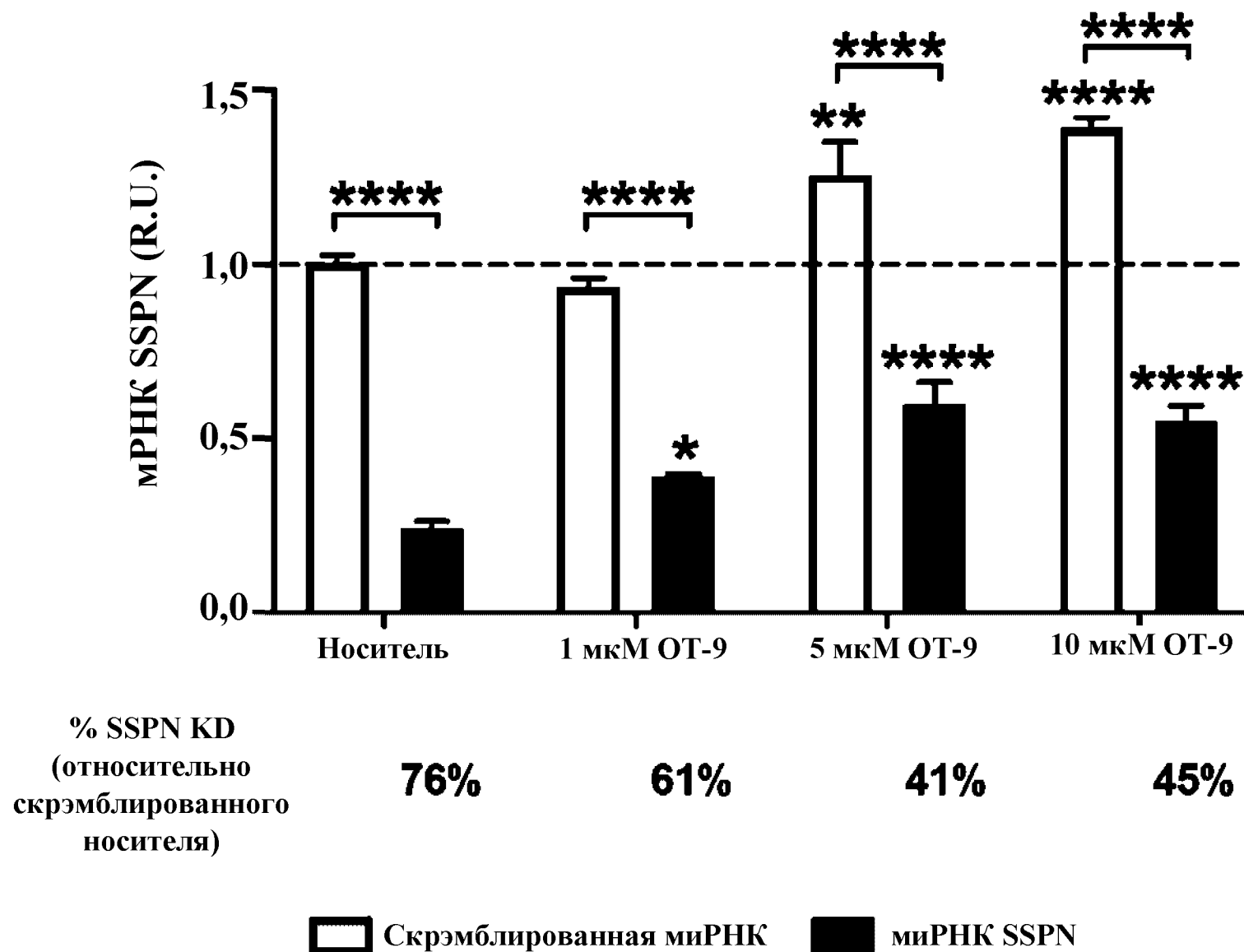
ФИГ. 10



ФИГ. 11



ФИГ. 12



ФИГ. 13

Соединение	Время инкубации (минуты)	% оставшегося соединения			Период полувыведения (минуты)		
		1	2	Среднее	1	2	Среднее
ОТ-9	0	100,0	100,0	100	470,7	452,4	462
	30	94,0	89,5	92			
	60	84,7	86,3	86			
	120	78,3	78,1	78			
	1440	11,6	10,5	11			
РС1-36	0	100,0	100,0	100	644,4	643,2	644
	30	94,8	88,2	92			
	60	71,0	69,6	70			
	120	43,7	48,5	46			
	1440	17,3	17,2	17			

ФИГ. 14

Соединение	Время инкубации (минуты)	% оставшегося соединения			Период полувыведения (минуты)		
		1	2	Среднее	1	2	Среднее
ОТ-9	0	100,0	100,0	100	50,1	48,1	49
	30	28,3	33,8	31			
	60	9,8	10,1	10			
	120	3,6	2,5	4			
	240	2,7	2,1	2			
	1440	0,6	0,5	1			
РС1-36	0	100,0	100,0	100	131,5	140,4	136
	30	81,5	79,7	81			
	60	66,8	55,9	61			
	120	37,1	46,4	46			
	240	27,5	29,0	28			
	1440	0,8	1,0	1			