

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045754**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.12.22**

(51) Int. Cl. **A61K 31/155** (2006.01)  
**C07C 257/18** (2006.01)

(21) Номер заявки  
**202191741**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.12.20**

**(54) АНАЛОГИ ПЕНТАМИДИНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **62/782,351**

(32) **2018.12.20**

(33) **US**

(43) **2021.10.25**

(86) **PCT/US2019/068156**

(87) **WO 2020/132636 2020.06.25**

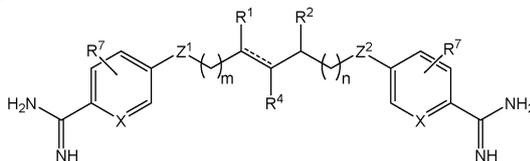
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**АУРАНСА ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Лудтке Грегори Р., Проттер Эндрю  
Эшер, Хелберг Анна, Люм Пек Е,  
Сукхун Раджаа, Элмер Сидни Пол,  
Чан Хак Цзинь (US)**

(74) Представитель:  
**Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,  
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)**

(56) **US-A1-20040063769  
WO-A2-2009051796  
US-A1-20150111965  
PUBCHEM. CID 4735. 25 March 2005, pp.  
1-42. Retrieved from the Internet <URL: https://  
pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4735>; page 2,  
formula**

(57) В настоящем изобретении предусмотрено соединение общей формулы (II) или его фармацевтически приемлемая соль, которые пригодны для лечения пролиферативного заболевания. Пролиферативное заболевание может включать солидный рак или рак крови. В данном документе раскрыты композиции, способы их синтеза и способы лечения различных видов рака с применением таких аналогов. В настоящем изобретении также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие по меньшей мере одно из таких соединений с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом для него.



Формула (II)

**045754 B1****045754 B1**

### Перекрестная ссылка на родственную заявку

Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США с серийным номером 62/782351, поданной 20 декабря 2018 г., которая полностью включена в настоящее описание посредством ссылки.

### Область техники

Настоящее изобретение относится к соединениям, пригодным для терапии или профилактики у млекопитающих, и в частности для лечения рака.

### Уровень техники

Пентамидин, 1,5-бис(4-амидинофенокси)пентан, стал использоваться в медицине в 1937 году и включен в Список основных лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения в качестве противопаразитарного/противогрибкового средства для лечения различных инфекционных заболеваний (например, Африканский трипаносомоз, лейшманиоз, бабезиоз и пневмония, вызванная *Pneumocystis carinii*). Хотя точный способ фармацевтического действия еще предстоит выяснить, известно, что пентамидин предпочтительно связывается с ДНК в малой бороздке АТ-богатых доменов, и предполагается, что он проявляет противораковую активность за счет своего ингибирующего действия на PRL (семейство фосфатаз регенерирующей печени), эндо-эксонуклеазную активность и взаимодействие между S100B и p53.

Несмотря на то, что пентамидин использовался в качестве активного терапевтического соединения в течение десятилетий, многочисленные побочные эффекты значительно ограничили его использование против паразитарных инфекций, и большая часть терапии, в которой используется это соединение, требует тщательного отслеживания побочных эффектов и зависимостей доза-эффект, поскольку оно может приводить к сахарному диабету и неблагоприятному воздействию на центральную нервную систему. В частности, среди его побочных эффектов пациенты, получающие терапию пентамидином, обычно демонстрируют временное повышение сывороточных трансаминаз печени (например, маркеры повреждения печени ALT и AST), что свидетельствует о повреждении печени. Из-за этих потенциально вредных последствий для жизненно важных органов разработка этого соединения в качестве противоракового лекарственного средства, для которого часто требуется повышенная доза, была строго ограничена, поскольку оно используется для лечения микробных инфекций.

Пентамидин можно вводить внутримышечно (IM) или внутривенно (IV). Однако для лечения инфекционных заболеваний рекомендуется только внутривенное введение. Это связано с тем, что соединение сильно страдает от низкой пероральной биодоступности. Некоторые исследования показали, что с токсическими побочными эффектами можно справиться, если лекарственное средство вводится посредством аэрозоля. Однако этот конкретный способ введения ограничен лечением пневмонии. Различные подходы, такие как пролекарства пентамидина, были предприняты для преодоления недостатков соединения в отношении пероральной биодоступности, но на сегодняшний день не сообщается об аналоге пентамидина, который обеспечивает безопасное и эффективное воздействие на терапевтических уровнях, особенно посредством перорального приема со сниженной токсичностью.

Учитывая токсические побочные эффекты пентамидина, существует острая необходимость в безопасных и эффективных, нетоксичных аналогах пентамидина, которые демонстрируют повышенное нацеливание на органы, что может позволить провести онкологические клинические разработки, предназначенные для конкретных типов рака.

### Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показаны *in vivo* эффекты соединения 1 на ортотопических бестимусных мышьях BALB/c, несущих линию клеток рака печени. Мыши получали соединение 1 в дозах от 10 мг/кг до 20 мг/кг перорально (п/о.), раз в 3 суток в течение недели, затем ежедневно в течение 3 недель.

На фиг. 2 показана масса всей печени мышьях, получавших соединение 1 в дозе 10 мг на кг и 20 мг на кг по сравнению с носителем.

На фиг. 3 показаны изображения мышьях, несущих линию клеток рака печени, обработанных соединением 1.

На фиг. 4 показаны *in vivo* эффекты соединения 1 на уровни трансаминаз в печени (ALT, AST и ALP).

На фиг. 5 показаны изменения массы тела у бестимусных мышьях BALB/c, получавших соединение 1 в дозах 5 мг на кг, 10 мг на кг, 10 мг на кг раз в 2 суток, 20 мг на кг и 40 мг на кг перорально (П/О).

На фиг. 6 показаны относительные изменения массы тела (%) от исходного уровня в исследовании MTD соединения 1 на бестимусных мышьях BALB/c.

На фиг. 7 показано воздействие на печень соединения 1 (20 мг на кг), соединения 5 (10 мг на кг) и пентамидина (20 мг на кг).

На фиг. 8 показано воздействие соединения 1 в печени, почках, тонком кишечнике, подвздошной кишке и плазме крови.

На фиг. 9 изображена цитотоксичность соединения 1 по сравнению с таковыми пентамидина и цисплатина в клеточной линии Нер3В.

На фиг. 10 показано изменение массы тела с течением времени у бестимусных мышьях BALB/c, получавших соединение 1 в дозе 10 мг/кг раз в сутки, 20 мг/кг раз в сутки, 40 мг/кг раз в сутки, 10 мг/кг два

раза в сутки и 20 мг/кг два раза в сутки в ортопедической модели рака толстой кишки.

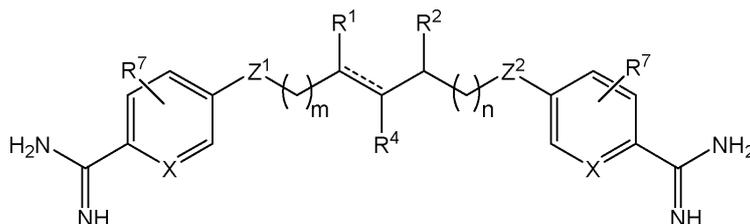
На фиг. 11 показано изменение биолюминесценции по сравнению с исходным уровнем у мышей BALB/c, несущих люциферазу, стабильно экспрессирующую опухолевые клетки рака толстой кишки (COLO 205-Luc), получавших соединение 1 в дозе 10 мг/кг раз в день, 20 мг/кг раз в день, 40 мг/кг раз в день, 10 мг/кг два раза в день и 20 мг/кг два раза в день. Приведенные значения R относятся к 28-му дню для каждой обработки по сравнению с носителем.

#### Краткое описание

Настоящее изобретение относится к группе аналогов ароматического (например, пиридинил, пиридинил, пиазинил или фенил) диамида и фармацевтически приемлемых солей, которые пригодны для лечения пролиферативного заболевания. Пролиферативное заболевание может включать солидный рак или рак крови. В данном документе раскрыты композиции, способы их синтеза и способы лечения различных видов рака с применением таких аналогов. В настоящем изобретении также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие по меньшей мере одно из таких соединений с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом для него.

Настоящее изобретение основано на открытии того, что аналоги пентамида пригодны для лечения различных типов рака, включая, но не ограничиваясь ими, рак печени, рак легких, рак толстой кишки, холангиокарциному, рак почек, рак желудка, меланому, рак яичников, рак молочной железы и рак поджелудочной железы. Эти соединения ароматического диамида демонстрируют аналогичную или повышенную цитотоксичность против раковых клеток по сравнению с пентамидом, а также демонстрируют улучшенную фармакокинетику и фармакодинамику для печени со значительно повышенной пероральной биодоступностью, что делает соединения значительно более безопасными, чем пентамидин или другие молекулы стандарта лечения. В целом, эти свойства делают соединения по настоящему изобретению очень пригодными для клинических исследований для лечения рака.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к композициям аналогов пентамида, имеющих формулу (II):



формула (II)

или его фармацевтически приемлемая соль, где

==== представляет собой одинарную или двойную связь;

m или n независимо представляет собой целое число, составляющее 0, 1, 2 или 3;

$Z^1$  или  $Z^2$  независимо представляет собой O или  $CR^5R^6$ ;

только один из X представляет собой N, а второй X представляет собой  $CR_7$ ;

каждый из  $R^1$  и  $R^2$  независимо представляет собой водород,

или  $R^1$ , взятый вместе с  $R^2$ , образует 5-, 6- или 7-членный циклоалкил;

$R^4$  представляет собой водород;

$R^5$  и  $R^6$  представляют собой водород,

и

$R^7$  представляет собой водород.

В одном варианте осуществления  $R^1$  и  $R^2$  независимо представляют собой водород. В одном конкретном варианте осуществления  $R^1$ , взятый вместе с  $R^2$ , образует 5-членный циклоалкил. В другом конкретном варианте осуществления  $R^1$ , взятый вместе с  $R^2$ , образует 6-членный циклоалкил. В еще другом конкретном варианте осуществления  $R^1$ , взятый вместе с  $R^2$ , образует 7-членный циклоалкил.

#### Подробное описание

Если в данном документе не указано иное, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, имеют значения, которые обычно понимаются специалистами в данной области техники. Значение и объем терминов должны быть ясны, однако в случае любой скрытой двусмысленности определения, приведенные в данном документе, имеют приоритет над любым словарным или посторонним определением. Использование термина "включающий", а также других форм термина, таких как "включает" и "включенный", не является ограничивающим.

Как используется в данном документе, формы единственного числа означают "по меньшей мере один" или "один или несколько."

Как используется в данном документе, "или" означает "и/или".

Как используется в данном документе, термин "алкил" относится к насыщенным углеводородным группам в линейной, разветвленной или циклической конфигурации или любой их комбинации, и, в частности, рассматриваемые алкильные группы включают группы, содержащие десять или менее атомов

углерода, особенно 1-6 атомов углерода, и низшие алкильные группы, имеющие 1-4 атома углерода. Иллюстративные алкильные группы представляют собой метил, этил, пропил, изопропил, бутил, втор-бутил, трет-бутил, пентил, изопентил, гексил, циклопропилметил и т.п. Алкильные группы могут быть незамещенными, или они могут быть замещенными в той степени, в которой такое замещение химически выполнимо. Подходящие заместители включают, но не ограничиваются ими, галоген, =O, =N-CN, =N-OR<sup>a</sup>, =NR<sup>a</sup>, -OR<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup><sub>2</sub>, -SR<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup><sub>2</sub>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup>CONR<sup>a</sup><sub>2</sub>, -NR<sup>a</sup>COOR<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup>COR<sup>a</sup>, -NO<sub>2</sub>, -CN, -COOR<sup>a</sup>, -CONR<sup>a</sup><sub>2</sub>, -OOCR<sup>a</sup>, -COR<sup>a</sup> и -R<sup>a</sup>, где каждый R<sup>a</sup> независимо представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-гетероалкил, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-гетероцикллил, C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>-гетероциклоалкил, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-ацил, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-гетероацил, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-гетероалкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-алкинил, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-гетероалкинил, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-арил или C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>-гетероарил, и каждый R<sup>a</sup> необязательно замещен галогеном, =O, =N-CN, =N-OR<sup>b</sup>, =NR<sup>b</sup>, -OR<sup>b</sup>, -NR<sup>b</sup><sub>2</sub>, -SR<sup>b</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>b</sup><sub>2</sub>, -NR<sup>b</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -NR<sup>b</sup>CONR<sup>b</sup><sub>2</sub>, -NR<sup>b</sup>COOR<sup>b</sup>, -NR<sup>b</sup>COR<sup>b</sup>, -NO<sub>2</sub>, -CN, -COOR<sup>b</sup>, -CONR<sup>b</sup><sub>2</sub>, -OOCR<sup>b</sup>, -COR<sup>b</sup>, и -R<sup>b</sup>, где каждый R<sup>b</sup> независимо представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-гетероалкил, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-гетероцикллил, C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>-гетероциклоалкил, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-ацил, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-гетероацил, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-гетероалкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-алкинил, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-гетероалкинил, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-арил или C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>-гетероарил. Алкильные, алкенильные и алкинильные группы могут быть замещены C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-ацилом, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-гетероацилом, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-арилом или C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>-гетероарилом, каждый из которых может быть замещен заместителями, которые подходят для конкретной группы. Если группа заместителя содержит R<sup>a</sup> или R<sup>b</sup> группы на одном и том же или смежных атомах (например, -NR<sup>b</sup> или -NR<sup>b</sup>-C(O)R<sup>b</sup>), две R<sup>a</sup> или R<sup>b</sup> группы могут необязательно быть взяты вместе с атомами в группе заместителя, к которой они присоединены, с образованием кольца с 5-8 членами в кольце, которые могут быть замещены, как разрешено для самих R<sup>a</sup> или R<sup>b</sup>, и могут содержать гетероатом (N, O или S) в качестве члена в кольце.

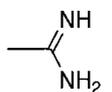
Используемый в данном документе термин "алкенил" относится к углеводородной цепи, содержащей по меньшей мере два атома углерода и по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод, и включает прямые, разветвленные или циклические алкенильные группы, содержащие от двух до десяти атомов углерода. Неограничивающие примеры "алкенила" включают этенильную, пропенильную, бутенильную, пентенильную и циклические алкенильные группы. Алкенил может быть незамещенным или замещенным одним или несколькими подходящими заместителями.

Используемый в данном документе термин "алкинил" относится к неразветвленным и разветвленным углеводородным фрагментам, имеющим по меньшей мере два (предпочтительно три) атома углерода и по меньшей мере одну тройную связь углерод-углерод, и включает этинил, пропирил, бутирил, циклопропилэтирил и тому подобное. Алкинил может быть незамещенным или замещенным одним или несколькими подходящими заместителями.

Как используется в данном документе, термин "алкокси" относится к алкильным группам, связанным выше через кислород, примеры которых включают метокси, этокси, пропилокси, изопророкси, трет-бутокси, метоксиэтокси, бензилокси, аллилокси и т.п. Кроме того, алкокси также относится к полиэфирам, таким как -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub> и т.п. Алкокси может быть любой углеводородной группой, связанной через атом кислорода, где углеводородная часть может иметь любое количество атомов углерода, обычно от 1 до 10 атомов углерода, может дополнительно включать двойную или тройную связь и может включать один или два атома кислорода, серы или азота в алкильных цепях. Алкокси может быть незамещенным или замещенным одним или несколькими подходящими заместителями, например, арилом, гетероарилом, циклоалкилом и/или гетероциклолилом.

Как используется в данном документе, термин "циклоалкил" относится к циклическому алкану, в котором цепь атомов углерода в углеводороде образует кольцо, и включает моноциклическую или полициклическую углеводородную кольцевую группу, например циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил, циклооктил, циклодецил, адамантил, норпинанил, декалинил, норборнил, хоузанил и т.п. Кроме того, циклоалкил может также включать одну или две двойных связи, которые образуют "циклоалкенильные" группы (например, циклопропенил, циклобутенил, циклопентенил, циклогексенил, циклогептенил, циклооктенил, норборненил, норборнадиенил и т.п.). Циклоалкил также может содержать один или несколько гетероатомов и называется "циклогетероалкил" и может включать, например, пиперазинил, пиперидинил, морфолинил, тиоморфолинил, оксанил, диоксанил (например, 1,4-диоксанил), тианил, дитианил, гексагидро-1,3,5-триазинил, триоксанил, тритианил, пирролидинил, имидазолидинил, пиранил, тетрагидропиранил, пиразолидинил, оксоланил, оксазолидинил, тиоланил, тиазолидинил, пирролинил, пиразолинил, имидазолинил, тетрагидропиранил и т.п. Циклоалкильная или циклогетероалкильная группа может быть незамещенной или замещенной одним или несколькими подходящими заместителями.

Как используется в данном документе, термин "амидин" или "Am" относится к группе -CNH<sub>2</sub>NH, как показано в следующей структуре:



Как используется в данном документе, термин "гетеро" относится к атому любого элемента, отлич-

ного от углерода или водорода. Как используется в данном документе, термин "гетероатом" означает азот (N), водород (O) или серу (S).

Как используется в данном документе, термин "гетероцикл" или "гетероцикли" охватывает все ограничения "циклогетероалкильной" и "гетероарильной" групп в части химической выполнимости. Термин "гетероцикл" или "гетероцикли" относится к любому соединению, в котором множество атомов образует кольцо через множество ковалентных связей, при этом кольцо содержит по меньшей мере один атом, отличный от атома углерода, в качестве члена кольца. Гетероцикл может быть насыщенным, ненасыщенным или частично ненасыщенным. Ненасыщенный гетероцикл может быть ароматическим арилом. Неограничивающие примеры гетероциклического кольца включают 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8- и 9-членные моноциклические кольца, содержащие один или несколько N, O или S в качестве неуглеродного члена(ов) и являются следующими: (1) насыщенное 3-атомное гетероциклическое кольцо может представлять собой, например, азиридирил, диазиридирил, оксиранил, диоксиранил, оксазиридирил, тирианил или т.п., а ненасыщенное 3-атомное гетероциклическое кольцо может представлять собой, например, азиририл, оксиренил, тириенил, диазиририл или т.п.; (2) насыщенное 4-атомное гетероциклическое кольцо может представлять собой, например, азетидинил, диазетидинил, оксетанил, диоксетанил, тиетанил, дитиетанил и т.п., а ненасыщенное 4-атомное гетероциклическое кольцо может представлять собой, например, азетил, диазетил, оксетил, диоксетил, тиетил, дитиетил или т.п.; (3) насыщенное 5-атомное гетероциклическое кольцо может представлять собой, например, пирролидинил, имидазолидинил, пирозолидинил, оксоланил, оксазолидинил, тиоланил, тиазолидинил или т.п., а ненасыщенное и частично ненасыщенное 5-атомное гетероциклическое кольцо может представлять собой, например, пирролил, пирролинил, пиразолил, пиразолинил, имидазолил, имидазолинил, триазолил, тетразолил, тиофенил, тиазолил, дитиазолил, тиазолинил, изотиазолил, тиадиазолил, фуранил, фуразанил, оксазолил, изоксазолил, оксадиазолил или т.п.; (4) насыщенное 6-атомное гетероциклическое кольцо может представлять собой, например, пиперидинил, пиперазинил, морфолинил, тиоморфолинил, оксанил, диоксанил (например 1,4-диоксациклогексан), тианил, дитианил, гексагидро-1,3,5-триазинил, триоксанил, тритианил или т.п., и ненасыщенное 6-атомное гетероциклическое кольцо может представлять собой, например, пиридинил, диазинил (например, пиримидинил или пиридазинил), пиранил, оксазинил (например, 1,2-оксазинил; 1,3-оксазинил или 1,4-оксазинил), тиазинил, 1,4-диоксинил, дитиинил, триазинил (например, 1,2,3-триазинил, 1,2,4-триазинил или 1,3,5-триазинил), тетразинил, пентазинил, тиопиранил или т.п.; (5) насыщенное 7-атомное гетероциклическое кольцо может представлять собой, например, азапанил, диазепанил, оксепанил, тиепанил или т.п., а ненасыщенное 7-атомное гетероциклическое кольцо может представлять собой, например, азапинил, диазепинил, оксепинил, тиепинил, тиазепинил или т.п.; (6) насыщенное 8-атомное гетероциклическое кольцо может представлять собой, например, азоканил, оксоканил, тиоканил или т.п., а ненасыщенное 8-атомное гетероциклическое кольцо может представлять собой, например, азоцинил, оксоцинил, тиоцинил или т.п.; и (7) насыщенное 9-атомное гетероциклическое кольцо может представлять собой, например, азонанил, оксонанил, тионанил или т.п., а ненасыщенное 9-атомное гетероциклическое кольцо может представлять собой, например, азонинил, оксонинил, тионинил или т.п. Дополнительные предполагаемые гетероциклы могут быть конденсированы, например, ковалентно связаны с двумя атомами в первой негетероциклической группе (например, фенил) с одним или двумя гетероциклами (например, 1,4-диоксанил, 1,4-диоксинил и тетрагидропиранил), или ковалентно связаны с двумя атомами в первом гетероциклическом кольце (например, пирролил, имидазолил, тиазолил, пиримидинил и пиридинил) с одной или двумя негетероциклическими или гетероциклическими группами (например, 1,4-диоксанил, 1,4-диоксинил и морфолинил) и вместе взятые, таким образом, называются "конденсированным гетероциклом", или "конденсированными гетероциклическими фрагментами", или "гетероарил-конденсированным циклогетероалкилом", как используется в данном документе. Конденсированный гетероцикл может быть, например, насыщенным или ненасыщенным (например, ароматическим) бициклическим или трициклическим соединением. Неограничивающие примеры слитого гетероцикла включают дигидробензодиоксинил, дигидродиоксинопиридинил, дигидродиоксинопиридазинил, дигидродиоксинопиримидинил, дигидродиоксинопиразинил, дигидропирролопиридинил, тетрагидронафтиридинил, тетрагидропиридопиридазинил, тетрагидропиридопиразинил, тетрагидропиридопиримидинил, хроманил, индолил, пуририл, изоиндолил, хинолинил, изохинолинил, хиноксалинил, хиназолинил, хинолизинил, 1,8-нафтиридинил, пиридо[3,2-d]пиримидинил, пиридо[4,3-d]пиримидинил, пиридо[3,4-b]пиразинил, пиридо[2,3-b]пиразинил, птеридинил, акридинил, циннолинил, фталазинил, бензимидазолил, феназинил, феноксазинил, фенотиазинил, феноксатиинил, бензазепинил, бензодиазепинил, бензофуранил, дибензофуранил, изобензофуранил, бензотиофенил, бензоксазинил, хинолин-2(1H)-онил, изохинолин-1(2H)-онил, индазолил, бензоксазолил, бензизоксазолил, бензотиазолил, дибензазепинил, дибензоксепинил, дибензотиазепинил, дибензотиепинил, карбазолил, флуоренил и т.п. Если гетероциклическое кольцо является ароматическим, оно также может называться в данном документе "гетероарил" или "гетероароматическое соединение", как описано ниже. Гетероциклическое кольцо, которое не является ароматическим, может быть замещено любой группой, подходящей для заместителей алкильной группы, описанных выше.

Как используется в данном документе, термин "арил" относится к незамещенным или замещенным

ароматическим моноциклическим или полициклическим группам, которые могут дополнительно содержать один или несколько неуглеродных атомов. Термин "арил" также включает ароматические кольца, конденсированные с неароматическим карбоциклическим кольцом или с гетероциклической группой, имеющей 1-7 гетероатомов. Термин "арил" может использоваться взаимозаменяемо с "арильным кольцом", "ароматической группой" и "ароматическим кольцом". Арильная группа может содержать 1-9 гетероатомов, которые обычно называют "гетероариллом". Гетероарильные группы обычно содержат от 4 до 14 атомов, от 1 до 9 из которых независимо выбраны из группы, состоящей из N, O и S. В 5-8-членной ароматической группе, например, гетероарильная группа может содержать 1-4 гетероатома. Арил или гетероарил могут быть незамещенными или замещенными одним или несколькими подходящими заместителями.

Арил или гетероарил может быть моно- или полициклической (например, бициклической) ароматической группой. Типичные арильные группы включают, например, фенил, нафталинил и т.п. Типичные гетероарильные группы включают, например, хинолинил, пирролил, пиразолил, имидазолил, триазолил, тетразолил, тиофенил, тиазолил, дитиазолил, тиазолинил, изотиазолил, тиadiaзолил, фуранил, фуразанил, оксазолил, изоксазолил, оксадиазолил, пиридинил, диазинил (например пиразинил, пиримидинил или пиридазинил), триазинил (например, 1,2,3-триазинил, 1,2,4-триазинил или 1,3,5-триазинил), пиранил, оксазинил (например, 1,2-оксазинил, 1,3-оксазинил или 1,4-оксазинил), тиазинил, диоксинил, дитиинил, триазинил, тетразинил, пентазинил, тиопиранил, азепинил, диазепинил, оксепинил, тиепинил, тиазепинил, азацинил, оксоцинил, тиоцинил, азонинил, оксонинил, тионинил, индолил, индазолил, пуринил, изоиндолил, хинолинил, изохинолинил, хиноксалинил, акридинил, хиназолинил, циннолинил, фталазинил, бензимидазолил, бензофуранил, изобензофуранил, бензоксазолил, бензизоксазолил, бензотиазолил или т.п. Полициклические арильные или полициклические гетероарильные группы могут быть образованы путем слияния (т.е. ковалентного связывания) 2 атомов в первом арильном или гетероарильном кольце с по меньшей мере одной карбоциклической или гетероциклической группой, и поэтому их называют "конденсированный арил" или "гетероарил-конденсированный циклогетероалкил".

Как используется в данном документе, термин "гетероарил-конденсированный циклогетероалкил" относится к гетероциклической части, состоящей из моноциклической гетероарильной группы, такой как пиридинил или фуранил, конденсированной с циклогетероалкильной группой, в которой гетероарильная и циклогетероалкильная части определены в данном документе. Примеры гетероарил-конденсированных гетероциклоалкильных групп включают дигидродиоксинопиридинил, дигидродиоксинопиридазинил, дигидродиоксинопиримидинил, дигидродиоксинопиразинил, дигидродиоксинотриазинил, дигидропирролопиридинил, дигидрофуранопиридинил и диоксопиридинил. Гетероарил-конденсированная гетероциклоалкильная группа может быть присоединена к остальной части молекулы любым доступным атомом углерода или азота.

Типичные гетероарильные группы включают 5- или 6-членные моноциклические ароматические группы, такие как пиридинил, пиримидил, пиразинил, пиридазинил, тиенил, фуранил, пирролил, пиразолил, тиазолил, оксазолил, изотиазолил, изоксазолил, тиофенил, триазолил (1,2,4-триазолил и 1,2,3-триазолил), тетразолил, фуразанил, оксадиазолил (1,2,5-оксадиазолил и 1,2,3-оксадиазолил) и имидазолил и конденсированные бициклические фрагменты, образованные путем слияния одной из гетероциклических групп с фенильным кольцом или с любой из гетероароматических моноциклических групп, включая индолил, бензимидазолил, индазолил, бензотриазолил, изохинолил, хинолил, бензотиазолил, бензофуранил, пиразолопиридинил, пиразолопиримидинил, пиразолопиримидил, хиназолинил, хиноксалинил, циннолинил, имидазопиримидинил и т.п.

Как используется в данном документе, термин "моноциклический" относится к незамещенной или замещенной однокольцевой структуре. Как используется в данном документе, термины "полициклический" и "бициклический" относятся к незамещенной или замещенной многокольцевой структуре, которая включает по меньшей мере две кольцевые структуры, соединенные любыми двумя смежными атомами. Бициклическое кольцо может быть арильным или гетероарильным кольцом, конденсированным с ароматическим кольцом или неароматическим карбоциклическим кольцом, таким как циклоалкил или циклогетероалкил. Бициклическое кольцо также может быть неароматическим карбоциклическим кольцом, конденсированным с другим неароматическим карбоциклическим кольцом, таким как циклоалкил или циклогетероалкил. Неограничивающие примеры бициклических колец включают дигидробензодиоксинил, дигидродиоксинопиридинил, дигидродиоксинопиридазинил, дигидродиоксинопиримидинил, дигидродиоксинопиразинил, дигидропирролопиридинил, тетрагидронафтиридинил, тетрагидропиридопиридазинил, тетрагидропиридопиразинил, тетрагидропиридопиримидинил, хроманил, декалинил, пуринил, индолил, изоиндолил, хинолил, хиназолинил, бензимидазолил, имидазопиридинил, циннолинил, фталазинил, имидазопиримидинил и т.п. Любая моноциклическая или конденсированная бициклическая система, которая имеет характеристики ароматичности с точки зрения распределения электронов по кольцевой системе, включена в это определение. Она также включает бициклические группы, в которых по меньшей мере кольцо, которое непосредственно присоединено к остальной части молекулы, имеет характеристики ароматичности.

Арильные и гетероарильные группы могут быть замещены, если это разрешено. Подходящие заместители

тители включают, но не ограничиваются ими, галоген,  $R^a$ ,  $-OR^a$ ,  $-NR^a_2$ ,  $-SR^a$ ,  $-SO_2R^a$ ,  $-SO_2NR^a_2$ ,  $-NR^aSO_2R^a$ ,  $-NR^aCONR^a_2$ ,  $-NR^aCOOR^a$ ,  $-NR^aCOR^a$ ,  $-CN$ ,  $-COOR^a$ ,  $-CONR^a_2$ ,  $-OOCR^a$ ,  $-COR^a$ , и  $-NO_2$ , где каждый  $R^a$  независимо представляет собой  $H$ ,  $C_1$ - $C_8$ -алкил,  $C_2$ - $C_8$ -гетероалкил,  $C_3$ - $C_8$ -гетероциклический,  $C_4$ - $C_{10}$ -гетероциклоалкил,  $C_1$ - $C_8$ -ацил,  $C_2$ - $C_8$ -гетероацил,  $C_2$ - $C_8$ -алкенил,  $C_2$ - $C_8$ -гетероалкенил,  $C_2$ - $C_8$ -алкинил,  $C_2$ - $C_8$ -гетероалкинил,  $C_6$ - $C_{10}$ -арил или  $C_5$ - $C_{10}$ -гетероарил, и каждый  $R^a$  необязательно замещен галогеном,  $=O$ ,  $=N-CN$ ,  $=N-OR^b$ ,  $=NR^b$ ,  $-OR^b$ ,  $-NR^b_2$ ,  $-SR^b$ ,  $-SO_2R^b$ ,  $-SO_2NR^b_2$ ,  $-NR^bSO_2R^b$ ,  $-NR^bCONR^b_2$ ,  $-NR^bCOOR^b$ ,  $-NR^bCOR^b$ ,  $-CN$ ,  $-COOR^b$ ,  $-CONR^b_2$ ,  $-OOCR^b$ ,  $-COR^b$  и  $-NO_2$ , где каждый  $R^b$  независимо представляет собой  $H$ ,  $C_1$ - $C_8$ -алкил,  $C_2$ - $C_8$ -гетероалкил,  $C_3$ - $C_8$ -гетероциклический,  $C_4$ - $C_{10}$ -гетероциклоалкил,  $C_1$ - $C_8$ -ацил,  $C_2$ - $C_8$ -гетероацил,  $C_2$ - $C_8$ -алкенил,  $C_2$ - $C_8$ -гетероалкенил,  $C_2$ - $C_8$ -алкинил,  $C_2$ - $C_8$ -гетероалкинил,  $C_6$ - $C_{10}$ -арил или  $C_5$ - $C_{10}$ -гетероарил. Алкильные, алкенильные и алкинильные группы могут быть замещены  $C_1$ - $C_8$ -ацилом,  $C_2$ - $C_8$ -гетероацилом,  $C_6$ - $C_{10}$ -арилом или  $C_5$ - $C_{10}$ -гетероарилом, каждый из которых может быть замещен заместителями, которые подходят для конкретной группы. Если группа заместителя содержит  $R^a$  или  $R$  группы на одном и том же или смежных атомах (например,  $-NR^b_2$  или  $-NR^b-C(O)R^b$ ), две  $R^a$  или  $R^b$  группы могут необязательно быть взяты вместе с атомами в группе заместителя, к которой они присоединены, с образованием кольца с 5-8 членами в кольце, которые могут быть замещены, как разрешено для самих  $R^a$  или  $R^b$ , и могут содержать гетероатом ( $N$ ,  $O$  или  $S$ ) в качестве члена в кольце.

Термин "сульфонил" относится к группе  $SO_2$ -алкил,  $SO_2$ -замещенный алкил,  $SO_2$ -алкенил,  $SO_2$ -замещенный алкенил,  $SO_2$ -циклоалкил,  $SO_2$ -замещенный циклоалкил,  $SO_2$ -циклоалкенил,  $SO_2$ -замещенный циклоалкенил,  $SO_2$ -арил,  $SO_2$ -замещенный арил,  $SO_2$ -гетероарил,  $SO_2$ -замещенный гетероарил,  $SO_2$ -гетероцикл и  $SO_2$ -замещенный гетероцикл, где каждый алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероцикл и замещенный гетероцикл определены в данном документе.

Как используется в данном документе, термин "ацил" при использовании без "замещенного" модификатора относится к группе  $-C(O)R$ , в которой  $R$  представляет собой водород, алкил, арил, галогениды, аралкил или гетероарил, как эти термины определены в данном документе.

Как используется в данном документе, термин "ацилокси" относится к алканоильной группе с прямой или разветвленной цепью, имеющей от 1 до 6 атомов углерода, такой как формил, ацетил, пропаноил, бутирил, валерил, пивалоил и гексаноил, и арилкарбонильной группе, описанной ниже, или гетероарилкарбонильной группе, описанной ниже. Арильный фрагмент арилкарбонильной группы означает группу, содержащую от 6 до 16 атомов углерода, такую как фенил, бифенил, нафтил или пиренил. Гетероарильный фрагмент гетероарилкарбонильной группы содержит по меньшей мере один гетероатом из  $O$ ,  $N$  и  $S$ , такой как пиридинил, пиримидил, пирролил, фурил, бензофурил, тиенил, бензотиенил, имидазолил, триазолил, хинолил, изохинолил, бензоимидазолил, тиазолил, бензотиазолил, оксазолил и индолил.

Как используется в данном документе, термин "карбоновая кислота" относится к группе  $-C(O)OH$ .

Как используется в данном документе, термин "сложный эфир," как используется в данном документе, относится к группе  $-C(O)O-$ .

Как используется в данном документе, термин "нитро" означает  $-NO_2$ .

Как используется в данном документе, термин "циано" означает  $-CN$ .

Как используется в данном документе, термин "азидо" означает моновалентную группу, содержащую  $-N_3$ .

Как используется в данном документе, термин "сульфид" означает тиол,  $-SH$ .

Как используется в данном документе, термин "амин" означает первичный, вторичный и третичный амины,  $-R-NH_2$ ,  $-R-NH-R'$  и  $-R-N(R'')R'$  соответственно.

Как используется в данном документе, термин "амид" означает первичный, вторичный и третичный амиды,  $-R-C(O)NH_2$ ,  $-R-C(O)NH-R'$  и  $-R-C(O)NR'R''$  соответственно.

Как используется в данном документе, термин "карбонат" означает сложный эфир карбоновой кислоты, группы, содержащей  $C(=O)(O)_2$ .

Как используется в данном документе, термин "карбамат" означает группу, содержащую  $NH_2COOH$ .

Как используется в данном документе, термин "гидроксил" означает  $-OH$ .

Как используется в данном документе, термины "галогенид", "галоген" и "галид" означают фтор ( $-F$ ), хлор ( $-Cl$ ), бром ( $-Br$ ) и йод ( $-I$ ).

Как используется в данном документе, термин "галогеналкил" относится к любому алкилу, имеющему один или несколько атомов водорода, замененных одним или несколькими атомами галогена. Неограничивающие примеры галогеналкила включают  $-CF_3$ ,  $-CFH_2$ ,  $-CF_2H$  и т.п.

Как используется в данном документе, термин "арилалкил" относится к любому алкилу, в котором один или несколько атомов водорода заменены арильной или гетероарильной группой. Примеры арилалкила включают бензил ( $C_6H_5CH_2-$ ) и т.п.

Как используется в данном документе, термин "гидроксиалкил" относится к любому гидроксипроизводному алкила и включает любой алкил, в котором один или несколько атомов водорода заменены группой  $-OH$ .

Термин "галогеналкил" относится к алкильной группе, как описано выше, причем один или несколько атомов водорода на алкильной группе замещены галогеновой группой. Примеры таких групп включают, без ограничения, фторалкильные группы, такие как фторэтил, дифторметил, трифторметил, трифторэтил и т.п.

Термин "галогеналкокси" относится к группе алкил-О-, причем один или несколько атомов водорода на алкильной группе, замещенной галогеновой группой (например, -F, -Cl, -Br и -I), и включает, например, группы, такие как трифторметокси и т.п.

Термин "замещенный", как используется в данном документе, относится к замещению атома водорода незамещенной группы функциональной группой, и, в частности, предполагаемые функциональные группы включают нуклеофильные группы (например,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{CN}$  и т. д.), электрофильные группы (например,  $\text{C}(\text{O})\text{OR}$ ,  $\text{C}(\text{X})\text{OH}$  и т. д.), полярные группы (например,  $-\text{OH}$ ), неполярные группы (например, гетероцикл, арил, алкил, алкенил, алкинил и т. д.), ионные группы (например,  $-\text{NH}_3$ ) и галогены (например, -F, -Cl),  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{NHCONH}_2$ ,  $\text{OCH}_2\text{COOH}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CONH}_2$ ,  $\text{OCH}_2\text{CONHR}$ ,  $\text{NHCH}_2\text{COOH}$ ,  $\text{NHCH}_2\text{CONH}_2$ ,  $\text{NHSO}_2\text{R}$ ,  $\text{OCH}_2$ -гетероциклы,  $\text{PO}_3\text{H}$ ,  $\text{SO}_3\text{H}$ , аминокислоты и всех их химически приемлемые комбинации. Более того, термин "замещенный" также включает несколько степеней замещения, и если раскрыто или заявлено несколько заместителей, замещенное соединение может быть независимо замещено одним или несколькими раскрытыми или заявленными заместителями.

Если не указано иное, номенклатура заместителей, которые в данном документе явно не определены, достигается путем наименования концевой части функциональной группы, за которой следует смежная функциональная группа по направлению к точке присоединения. Например, заместитель "алкиларилоксикарбонил" относится к группе (алкил)-(арил)-О-С(О)-.

Что касается любой из описанных в данном документе групп, которые содержат один или несколько заместителей, следует понимать, что такие группы не содержат каких-либо замещений или схем замещения, которые являются стерически непрактичными и/или синтетически невыполнимыми. Кроме того, рассматриваемые соединения включают все стереохимические изомеры, возникающие в результате замещения этих соединений.

В дополнение к раскрытию в данном документе в определенном варианте осуществления замещенная группа имеет 1 заместитель, 1 или 2 заместителя, 1, 2 или 3 заместителя или 1, 2, 3 или 4 заместителя.

Как используется в данном документе, термин "введение" или "вводимый" рассматриваемого соединения относится к предоставлению соединения по изобретению субъекту, нуждающемуся в лечении.

Как используется в данном документе, термин "приемлемый" в отношении состава, композиции или ингредиента, как используется в данном документе, означает отсутствие стойкого вредного воздействия на общее состояние здоровья субъекта, подлежащего лечению.

Термин "около", если относится к числу или числовому диапазону, означает, что указанное число или числовой диапазон являются приблизительными в пределах колебаний показаний от эксперимента к эксперименту (или в пределах статистической экспериментальной ошибки), и, таким образом, число или числовой диапазон могут варьироваться, например, от 1% до 10% от указанного числа или числового диапазона.

Как используется в данном документе, термин "носитель" относится к химическим соединениям или агентам, которые способствуют включению соединения, описанного в данном документе, в клетки или ткани.

Как используется в данном документе, термины "содержать", "иметь" и "включать" являются неограничивающими связующими глаголами. Любые формы или времена одного или нескольких из этих глаголов, такие как "содержит", "содержащий", "имеет", "имеющий", "включает" и "включающий", не являются ограничивающими. Например, любой способ, который "подразумевает", "имеет" или "включает" один или несколько фрагментов, не ограничивается обладанием только этим одним или несколькими фрагментами, а также охватывает другие части, не указанные в списке.

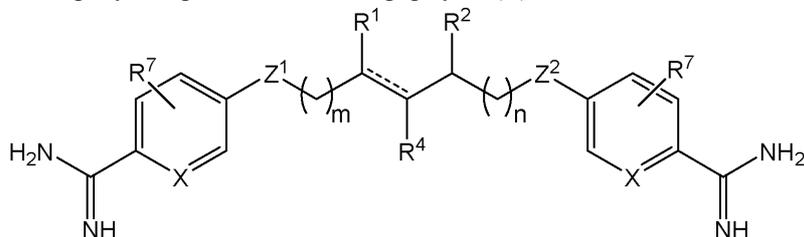
"Фармацевтически приемлемая соль" представляет собой соль, образованную кислотной и основной группой аналогов пентамидина. Примеры таких солей включают соли присоединения кислот и соли присоединения оснований, такие как соли неорганических кислот или соли органических кислот (например, соль хлористоводородной кислоты, соль дигидрохлористоводородной кислоты, соль серной кислоты, цитрат, соль бромистоводородной кислоты, соль йодистоводородной кислоты, соль азотной кислоты, бисульфат, соль фосфорной кислоты, соль суперфосфорной кислоты, соль изоникотиновой кислоты, соль уксусной кислоты, соль молочной кислоты, соль салициловой кислоты, соль винной кислоты, соль пантотеновой кислоты, соль аскорбиновой кислоты, соль янтарной кислоты, соль малеиновой кислоты, соль фумаровой кислоты, соль глюконовой кислоты, соль сахариновой кислоты, соль муравьиной кислоты, соль бензойной кислоты, соль глутаминовой кислоты, соль метансульфоновой кислоты, соль этансульфоновой кислоты, соль бензолсульфоновой кислоты, соль п-толуолсульфоновой кислоты, соль паминовой кислоты (памоат)), а также соли алюминия, кальция, лития, магния, кальция, натрия, цинка и диэтанолamina. Следует понимать, что ссылка на аналог пентамидина или его фармацевтически приемлемую соль включает фармацевтически приемлемые соли соединения, раскрытого в данном документе. Примеры таких фармацевтически приемлемых солей включают, но не ограничиваются ими, изетионат, глюконат и

мезилат.

Как используется в данном документе, термин "водород" относится к атому водорода (-H) и дейтерию (тяжелый водород, нерадиоактивный изотоп водорода, D или H). Следует понимать, что настоящее изобретение предусматривает варианты дейтерированных соединений всех молекул по настоящему изобретению, которые могут быть синтезированы путем преобразования атома водорода в H в месте, где присутствует атом водорода.

#### Аналоги пентамидина

В одном аспекте предусмотрено соединение формулы (II):



формула (II)

или его фармацевтически приемлемая соль, где

----- представляет собой одинарную или двойную связь;

m или n независимо представляет собой целое число, составляющее 0, 1, 2 или 3;

Z<sup>1</sup> или Z<sup>2</sup> независимо представляет собой O или CR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>;

только один из X представляет собой N, а второй X представляет собой CR<sub>7</sub>;

каждый из R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> независимо представляет собой водород,

или R<sup>1</sup>, взятый вместе с R<sup>2</sup>, образует 5-, 6- или 7-членный циклоалкил;

R<sup>4</sup> представляет собой водород;

R<sup>5</sup> и R<sup>6</sup> представляют собой водород,

и

R<sup>7</sup> представляет собой водород.

В описаниях в данном документе подразумевается, что каждое из описания, вариации, варианта осуществления или аспекта группы может быть объединено с каждым из описания, вариации, варианта осуществления или аспекта других групп, как если бы каждая комбинация описаний была конкретно и индивидуально перечислена. Например, каждое из описания, вариации, варианта осуществления или аспекта, представленных в данном документе в отношении R формулы (II), могут быть объединены с каждым из описания, вариации, варианта осуществления или аспекта X, n, m также, как если бы каждая комбинация была перечислена конкретно и отдельно. Также подразумевается, что все описания, вариации, варианты осуществления или аспекты формулы (II), где это применимо, в равной степени применимы к другим формулам, подробно описанным в данном документе, и одинаково описаны, как если бы все и каждое описание, вариант, вариант осуществления или аспект были указаны отдельно и индивидуально для всех формул.

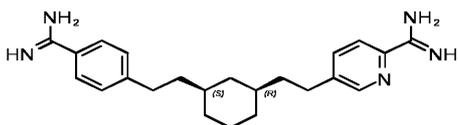
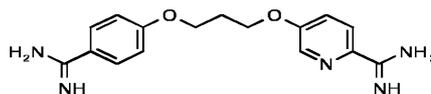
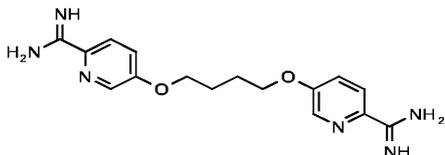
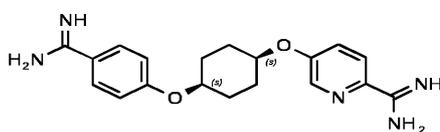
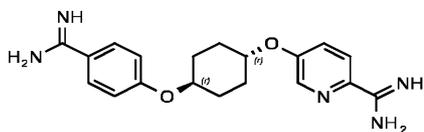
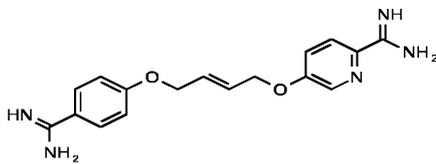
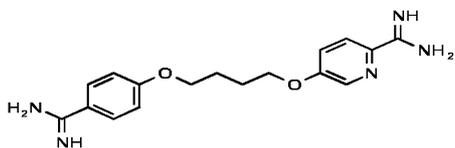
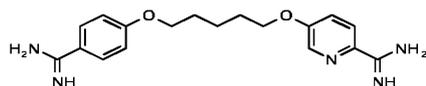
В одном варианте осуществления m равно 1, и n равно 1. В другом варианте осуществления m равно 1, и n равно 0. В другом варианте осуществления m равно 0, и n равно 1. В другом варианте осуществления m равно 1, и n равно 2. В другом варианте осуществления m равно 2, и n равно 1. В одном варианте осуществления m равно 2, и n равно 2. В другом варианте осуществления m равно 0, и n равно 0.

В одном варианте осуществления Z<sup>1</sup> или Z<sup>2</sup> независимо выбран из группы, состоящей из O, каждый из которых может быть необязательно замещен. В одном варианте осуществления Z<sup>1</sup> или Z<sup>2</sup> независимо представляет собой O, необязательно замещенный. В другом варианте осуществления Z<sup>1</sup> или Z<sup>2</sup> независимо представляет собой CR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>.

В одном варианте осуществления R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> независимо представляют собой водород. В одном конкретном варианте осуществления R<sup>1</sup>, взятый вместе с R<sup>2</sup>, образует 5-членный циклоалкил. В другом конкретном варианте осуществления R<sup>1</sup>, взятый вместе с R<sup>2</sup>, образует 6-членный циклоалкил. В еще другом конкретном варианте осуществления R<sup>1</sup>, взятый вместе с R<sup>2</sup>, образует 7-членный циклоалкил.

В одном варианте осуществления R<sup>4</sup> представляет собой водород. В одном варианте осуществления R<sup>5</sup> и R<sup>6</sup> представляют собой водород. В одном варианте осуществления R<sup>7</sup> представляет собой водород.

Иллюстративные соединения включает соединения следующих структур или их фармацевтически приемлемую соль:



### Способы

Соединения и композиции, подробно описанные в данном документе, такие как фармацевтическая композиция, содержащая соединение любой формулы, представленной в данном документе, или его соль и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, могут использоваться в способах введения и лечения, предусмотренных в данном документе. Понятно, что в любом из способов или фармацевтических композиций, подробно описанных в данном документе, можно использовать соединение любой формулы или его вариацию, подробно описанные в данном документе, или его фармацевтически приемлемую соль. В одном варианте осуществления любого из способов или фармацевтических композиций, детально описанных в данном документе, применяют соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль. В одном варианте осуществления любого из способов или фармацевтических композиций, детально описанных в данном документе, применяют соединение таблицы I или его фармацевтически приемлемую соль.

В данном документе предложен способ лечения рака, включающий введение описанных в данном документе соединений субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение солидной опухоли. В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение рака, выбранного из группы, состоящей из рака печени, холангиокарциномы, рака толстой кишки, печеночной холангиокарциномы и рака почки. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

Описанные в данном документе соединения и композиции можно вводить субъекту, нуждающемуся в лечении нарушения пролиферации клеток, такого как рак, в частности рак, выбранный из рака печени, холангиокарциномы, остеосаркомы, меланомы, рака молочной железы, рака почек, рака предстатель-

ной железы, рака желудка, колоректального рака, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака нейронов, рака легких, рака матки, лейкоза или лимфомы. Субъектом обычно является млекопитающее, которому диагностировано лечение одного или нескольких таких пролиферативных расстройств, и часто субъектом является человек. Способы включают введение эффективного количества по меньшей мере одного соединения по изобретению; необязательно соединение можно вводить в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, особенно терапевтическими агентами, которые, как известно, могут быть полезны для лечения рака или пролиферативного расстройства, поражающего конкретного субъекта. Специалисту в данной области будет понятно, что колоректальный рак и рак толстой кишки используются взаимозаменяемо, а рак почки и почечный рак используются взаимозаменяемо в настоящем изобретении.

Соединения по настоящему изобретению или их фармацевтически приемлемые соли обычно вводят в терапевтически эффективном количестве. Термин "терапевтически эффективное количество" может относиться к количеству (или дозе) соединения или другой терапии, которая необходима и достаточна для предотвращения, уменьшения, облегчения, лечения или устранения состояния или его риска при введении субъекту, который нуждается в таком соединении или другой терапии. Количество соединения, фактически вводимое субъекту, может быть определено врачом или лицом, осуществляющим уход, в свете соответствующих обстоятельств, включая состояние, подлежащее лечению, выбранный путь введения, вводимое соединение и его относительную активность, возраст, вес, реакцию отдельного пациента, тяжесть симптомов пациента и т.п. Таким образом, терапевтически эффективное количество может варьироваться, например, оно может варьироваться в зависимости от состояния субъекта, веса и возраста субъекта, тяжести состояния заболевания, способа введения и т.п.

Соединения по настоящему изобретению могут вводиться любым из принятых способов введения агентов, имеющих сходное применение, например, пероральным, кожным, местным, внутрикожным, интратекальным, внутривенным, подкожным, внутримышечным, внутрисуставным, интраспинальным или спинальным, назальным, эпидуральным, ректальным, вагинальным или трансдермальным/трансмукозальным путем. Подходящий путь будет зависеть от природы и тяжести состояния, подлежащего лечению. Пероральное введение может быть основным путем введения соединений по настоящему изобретению, поскольку они обычно демонстрируют повышенную пероральную биодоступность, а также улучшенное нацеливание на органы в комбинации с пониженной *in vivo* токсичностью. Однако внутривенное (IV) введение может быть способом введения соединений по настоящему изобретению. Внутримышечное (IM) введение может быть способом введения соединений по настоящему изобретению. Подкожное, подъязычное или чрескожное введение также может рассматриваться как способ введения соединений по настоящему изобретению. Подъязычное введение может быть осуществлено с использованием подходящей композиции для соединений. Ингаляционное введение также может быть использовано для способа введения с подходящим составом для соединений и типа рака, которому может быть полезен этот путь (например, рак легкого).

В конкретном примере фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, может вводиться пациенту-человеку перорально в дозе от около 0,1 мг на кг до около 300 мг на кг или даже до 500 мг на кг. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, предусмотренная в данном документе, может быть введена пациенту-человеку перорально в дозе от около 1 мг на кг до около 300 мг на кг ежедневно. В другом конкретном примере фармацевтическая композиция, предусмотренная в данном документе, может быть введена пациенту-человеку перорально в дозе от около 1 мг на кг до около 100 мг на кг.

Субъект может страдать от рака. Субъект может быть млекопитающим. Субъектом может быть пациентом-человеком, страдающим от рака. Примеры рака включают, но не ограничиваются ими, рак надпочечников, рак анального канала, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак крови, рак костей, опухоль головного мозга, рак молочной железы, рак сердечно-сосудистой системы, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак пищеварительной системы, рак эндокринной системы, рак эндометрия, рак пищевода, рак глаз, рак желчного пузыря, опухоль желудочно-кишечного тракта, рак почки, рак гортани, лейкемию, рак печени, рак легких, холангиокарциному, лимфому, мезотелиому, рак мышечной системы, миелодиспластический синдром, миелому, рак носовой полости, рак носоглотки, рак нервной системы, рак лимфатической системы, рак полости рта, рак ротоглотки, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак полового члена, опухоли гипофиза, рак простаты, рак репродуктивной системы, рак дыхательной системы, саркому, рак слюнных желез, рак скелетной системы, рак кожи, рак тонкой кишки, рак желудка, рак яичек, рак вилочковой железы, рак щитовидной железы, рак мочевого пузыря или рак влагалища. В одном варианте осуществления субъект страдает от рака печени. В другом варианте осуществления субъект страдает от холангиокарциномы. В другом варианте осуществления субъект страдает от печеночной холангиокарциномы. В еще другом варианте осуществления субъект страдает от рака почки. В еще другом варианте осуществления субъект страдает от рака толстой кишки. В еще другом варианте осуществления субъект страдает от рака легкого (например, мелкоклеточного рака легкого или немелкоклеточного рака легкого). В еще другом варианте осуществления субъект страдает от рака молочной железы. В еще другом варианте осуществления субъект страдает от рака яичников.

Примеры рака включают виды рака, вызывающие солидные опухоли, а также виды рака, не вызывающие солидных опухолей. Кроме того, любой из упомянутых в данном документе видов рака может быть первичным раком (например, раком, названным в честь той части тела, где он впервые начал расти) или вторичным или метастатическим раком (например, раком, возникшим из другой части тела).

В некоторых вариантах осуществления, представленных в данном документе, способ ингибирования пролиферации раковых клеток у субъекта включает введение субъекту соединения, представленного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления ингибируется по меньшей мере около 10% (включая, например, по меньшей мере любое из около 20%, около 30%, около 40%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90% или около 100%) пролиферации клеток. В некоторых вариантах осуществления в некоторых вариантах осуществления пролиферация солидной опухоли ингибируется. В некоторых вариантах осуществления ингибируется пролиферация клеток рака печени. В некоторых вариантах осуществления ингибируется пролиферация клеток рака толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления ингибируется пролиферация клеток рака почки. В некоторых вариантах осуществления пролиферация клеток холангиокарциномы ингибируется.

В данном документе также предоставляется способ ингибирования метастазирования опухоли у субъекта, включающий введение субъекту соединения, представленного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления ингибируется по меньшей мере около 10% (в том числе, например, по меньшей мере любое из около 20%, около 30%, около 40%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90% или около 100%) метастазирования. В некоторых вариантах осуществления ингибируется метастазирование рака печени. В некоторых вариантах осуществления ингибируется метастазирование рака толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления ингибируется метастазирование рака почки. В некоторых вариантах осуществления ингибируется метастазирование холангиокарциномы. В любом из вышеуказанных вариантов осуществления ингибируется метастазирование в лимфатические узлы, легкие, кости или мозг. В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления метастазирование опухоли может ингибироваться в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 недель после лечения.

В некоторых вариантах осуществления способ включает уменьшение размера опухоли и/или опухолевой нагрузки у субъекта. В некоторых вариантах осуществления размер опухоли уменьшается на по меньшей мере около 10% (включая, например, по меньшей мере любое из около 20%, около 30%, около 40%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90% или около 100%). В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой рак печени. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой рак почки. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой рак толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой холангиокарциному.

В некоторых вариантах осуществления способ включает продление выживаемости без прогрессирования у человека. В некоторых вариантах осуществления способ продлевает время до прогрессирования заболевания на по меньшей мере любое из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 недель. В некоторых вариантах осуществления у субъекта присутствует солидная опухоль. В некоторых вариантах осуществления у субъекта присутствует рак печени. В некоторых вариантах осуществления у субъекта присутствует рак почки. В некоторых вариантах осуществления у субъекта присутствует рак толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления у субъекта присутствует холангиокарцинома.

В некоторых вариантах осуществления способ включает облегчение одного или нескольких симптомов у субъекта с раком. В некоторых вариантах осуществления у субъекта присутствует солидная опухоль. В некоторых вариантах осуществления у субъекта присутствует рак печени. В некоторых вариантах осуществления у субъекта присутствует рак почки. В некоторых вариантах осуществления у субъекта присутствует рак толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления у субъекта присутствует холангиокарцинома.

В некоторых вариантах осуществления способ включает улучшение качества жизни у субъекта с раком. В некоторых вариантах осуществления у субъекта присутствует солидная опухоль. В некоторых вариантах осуществления у субъекта присутствует рак печени. В некоторых вариантах осуществления у субъекта присутствует рак почки. В некоторых вариантах осуществления у субъекта присутствует рак толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления у субъекта присутствует холангиокарцинома.

В некоторых вариантах осуществления способ приводит к объективному ответу (например, частичному или полному ответу) у пациента с раком. В некоторых вариантах осуществления у субъекта присутствует солидная опухоль. В некоторых вариантах осуществления у субъекта присутствует рак печени. В некоторых вариантах осуществления у субъекта присутствует рак почки. В некоторых вариантах осуществления у субъекта присутствует рак толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления у субъекта присутствует холангиокарцинома.

В некоторых вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению не метаболизируются цитохромом Р-450, что приводит к снижению токсичности, в частности гепатотоксичности, по сравнению с существующими методами лечения. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, предусмотренных в данном документе, предусмотрен способ лечения рака у субъекта, где у субъекта присутствует сниженная функция печени. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет балл по шкале Чайлда-Пью класса В или класса С.



около 1 дня до около 7 дней.

#### Комбинированная терапия

Изобретение, представленное в данном документе, описывает способы лечения рака у субъекта путем введения субъекту по меньшей мере одного соединения согласно настоящему изобретению. Раскрытые в данном документе способы могут дополнительно включать введение субъекту комбинации соединения формул (II) или его фармацевтически приемлемой соли и по меньшей мере одного дополнительно противоракового средства, при этом комбинированная композиция может вводиться в виде совместного препарата или отдельно.

В определенных конкретных вариантах осуществления субъекту за один раз можно вводить более одного соединения согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления два соединения по настоящему изобретению в комбинации могут действовать синергетически или в дополнение, и любое соединение может использоваться в меньшем количестве, чем при введении отдельно.

В некоторых вариантах осуществления раскрытые в данном документе соединения и/или их фармацевтические композиции вводят одновременно с введением другого терапевтического средства. Например, раскрытые в данном документе соединения и/или их фармацевтические композиции можно вводить вместе с другим терапевтическим средством. В других вариантах осуществления раскрытые в данном документе соединения и/или их фармацевтические композиции вводят до или после введения других терапевтических средств.

В комбинированной терапии дополнительным терапевтическим средством(-ами), используемым в комбинированной терапии, может быть противораковый агент, такой как эпозид, цисплатин, оксалиплатин, гемцитабин, иринотекан, антрациклин и таксол.

Как используется в данном документе, термин "терапевтически эффективное количество" означает количество аналога пентамидина как в формулах (II) или его фармацевтически приемлемой соли. Доза соединения, подлежащего введению согласно настоящему изобретению, будет определяться в свете конкретных обстоятельств, связанных со случаем, включая, например, вводимое соединение, способ введения, состояние пациента, стадию рака и физические свойства противоракового лекарственного средства, используемого в комбинаторной терапии.

Для введения субъекту аналог пентамидина или его фармацевтически приемлемая соль обычно включены в фармацевтическую композицию и фармацевтически приемлемый носитель. Терапевтические композиции обычно стерильны и достаточно стабильны в условиях производства и хранения.

Существует множество типов противораковых подходов, которые можно использовать в сочетании с аналогом пентамидина или его фармацевтически приемлемой солью, например, лечение химиотерапевтическими агентами, биологическими агентами, облучение и хирургическое вмешательство. В способах по настоящему изобретению можно использовать эти подходы для лечения тех же типов рака, для которых они используются в данной области. Кроме того, эти подходы могут осуществляться в соответствии с параметрами (например, схемами лечения и дозами), аналогичными тем, которые известны в данной области техники для их использования.

Химиотерапевтические препараты нескольких различных типов, включая, например, антимаболиты, антибиотики, алкилирующие агенты, растительные алкалоиды, гормональные агенты, антикоагулянты, антитромботические средства и другие природные продукты, среди прочего, могут использоваться вместе с аналогами пентамидина, описанными в данном документе.

В данной области известны многочисленные подходы к введению противораковых лекарственных средств, и их можно легко адаптировать для использования в настоящем изобретении. Предпочтительный путь введения представляет собой пероральное введение для комбинированной терапии. Для системного введения лекарственные средства можно вводить, например, путем внутривенной инъекции или инфузии (непрерывной или болюсной). Соответствующий график и дозировку такого введения могут легко определить специалисты в данной области, основываясь, например, на доклинических исследованиях на животных и клинических исследованиях (например, исследования фазы I) на людях. Многие схемы лечения, используемые для введения химиотерапевтических лекарственных средств, включают, например, внутривенное введение лекарственного средства (или лекарственных средств) с последующим повторением этого лечения через период (например, 1-4 недели), в течение которого пациент восстанавливается от любых побочных эффектов лечения. Может быть желательно использовать оба лекарственных средства при каждом введении или, альтернативно, чтобы некоторые (или все) виды лечения включали только одно лекарственное средство.

#### Фармацевтическая композиция

Соединения по настоящему изобретению могут вводиться любым из принятых способов введения агентов, имеющих сходное применение, например, пероральным, кожным, местным, внутрикожным, интратекальным, внутривенным, подкожным, внутримышечным, внутрисуставным, интраспинальным или спинальным, назальным, эпидуральным или трансдермальным/трансмукозальным ингаляционным путем.

В одном конкретном примере фармацевтическая композиция может быть введена пациенту перорально. В другом конкретном примере фармацевтическая композиция, содержащая пентамидин или его

фармацевтически приемлемую соль, может быть введена пациенту внутривенно (например, путем инъекции или инфузии). В другом конкретном примере фармацевтическая композиция может быть введена пациенту внутримышечно. В конкретном примере фармацевтическая композиция может быть введена пациенту через нос. Фармацевтическая композиция (например, для перорального введения или для ингаляции, инъекции, инфузии, подкожной доставки, внутримышечной доставки, внутрибрюшинной доставки, подязычной доставки или других способов) может быть в форме жидкости. Жидкая фармацевтическая композиция может содержать, например, одно или несколько из следующего: стерильный разбавитель, такой как вода, физиологический раствор, предпочтительно физиологический солевой раствор, раствор Рингера, изотонический хлорид натрия, нелетучие масла, которые могут служить растворителем или суспендирующей средой, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные агенты; антиоксиданты; хелатирующие агенты; буферы и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Композиция для парентерального введения может быть заключена в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы для многократных доз, изготовленные из стекла или пластика. Предпочтительно использование физиологического раствора, а фармацевтическая композиция для инъекций предпочтительно стерильна. Жидкая фармацевтическая композиция может быть доставлена перорально.

Фармацевтическая композиция, содержащая соединение формул (I)-(VIII) или его фармацевтически приемлемую соль, может быть составлена для отсроченного или медленного высвобождения (также называемого замедленным высвобождением или контролируемым высвобождением). Такие композиции могут быть получены с использованием хорошо известной технологии и введены, например, пероральной, ректальной, внутрикожной или подкожной имплантацией или имплантацией в желаемое целевое место. Композиции с замедленным высвобождением могут содержать соединение, диспергированное в матрице носителя и/или содержащееся в резервуаре, окруженном мембраной, регулирующей скорость. Вспомогательные вещества для использования в таких композициях являются биосовместимыми и могут быть биоразлагаемыми; предпочтительно композиция обеспечивает относительно постоянный уровень высвобождения активного компонента. Неограничивающие примеры вспомогательных веществ включают воду, спирт, глицерин, хитозан, альгинат, хондроитин, витамин E, минеральное масло и диметилсульфоксид (ДМСО). Количество соединения, содержащегося в композиции с замедленным высвобождением, зависит от места имплантации, скорости и ожидаемой продолжительности высвобождения, а также природы состояния, заболевания или расстройства, подлежащее лечению или предотвращению.

Фармацевтическая композиция, содержащая один или несколько аналогов пентамидина или их фармацевтически приемлемую соль, может быть эффективна с течением времени. В некоторых случаях фармацевтическая композиция может быть эффективна один или несколько дней. В некоторых случаях длительность эффективности фармацевтической композиции действует в течение длительного периода времени. В некоторых случаях эффективность фармацевтической композиции может превышать 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 1 месяц.

При изготовлении фармацевтической композиции, содержащей один или несколько аналогов пентамидина или его фармацевтически приемлемую соль, активный ингредиент может быть разбавлен вспомогательным веществом. Некоторые примеры подходящих вспомогательных веществ включают лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, крахмалы, аравийскую камедь, фосфат кальция, альгинаты, трагакант, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, ПЭГ, поливинилпирролидон, целлюлозу, воду, стерильный физиологический раствор, сироп и метилцеллюлозу. Композиции согласно настоящему изобретению могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечивать быстрое, замедленное или отсроченное высвобождение активного ингредиента после введения пациенту с использованием процедур, известных в данной области. В некоторых случаях фармацевтическая композиция, содержащая пентамидин или его фармацевтически приемлемую соль, может содержать вспомогательное средство, которое может обеспечивать долгосрочное хранение, увеличивать объем композиции, содержащей мощный активный ингредиент, облегчать абсорбцию лекарственного средства, снижать вязкость, добавлять ароматизатор или усиливать растворимость фармацевтической композиции.

В некоторых случаях фармацевтическая композиция, содержащая аналог пентамидина или его фармацевтически приемлемую соль, может содержать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель может включать любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель подходит для перорального введения. Активное соединение может быть покрыто материалом для защиты соединения от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать соединение. Носитель может подходить для парентерального (например, внутривенного, внутримышечного, подкожного, интратекального) введения (например, путем инъекции или инфузии).

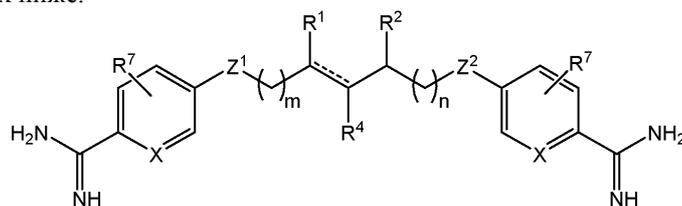
Настоящее изобретение также предполагает составление фармацевтически приемлемой соли соединения формул (II). Как правило, фармацевтические соли могут включать, но не включены, соли и соли присоединения оснований (например, соль хлористоводородной кислоты, соль дигидрохлористоводородной кислоты, соль серной кислоты, цитрат, соль бромистоводородной кислоты, соль йодистоводо-

родной кислоты, соль азотной кислоты, бисульфат, соль фосфорной кислоты, соль суперфосфорной кислоты, соль изоникотиновой кислоты, соль уксусной кислоты, соль молочной кислоты, соль салициловой кислоты, соль винной кислоты, соль пантотеновой кислоты, соль аскорбиновой кислоты, соль янтарной кислоты, соль малеиновой кислоты, соль фумаровой кислоты, соль глюконовой кислоты, соль сахариновой кислоты, соль муравьиной кислоты, соль бензойной кислоты, соль глутаминовой кислоты, соль метансульфоновой кислоты, соль этансульфоновой кислоты, соль бензолсульфоновой кислоты, соль п-толуолсульфоновой кислоты, соль палмовой кислоты (пальмитат)), а также соли алюминия, кальция, лития, магния, кальция, натрия, цинка и диэтаноламина.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует рассматривать как дополнительное ограничение. Содержание всех ссылок, патентов и опубликованных патентных заявок, цитируемых в этом документе, а также фигур и приложений последовательно, представленных в данном документе, явным образом включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

### Примеры

Аналоги пентамидина были разработаны и синтезированы (см. таблицу 1) с использованием способов синтеза, описанных ниже.

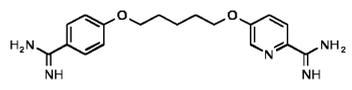
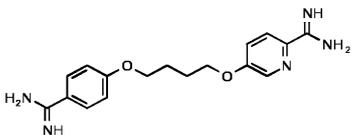
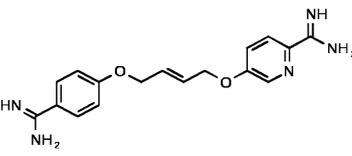


формула (II),

Общая информация

Спектры <sup>1</sup>H ЯМР и <sup>13</sup>C регистрировали на спектрометрах Varian 400 МГц или Bruker Avance III 500 МГц. Спектры относятся к остаточному хлороформу (δ 7,26, <sup>1</sup>H), ДМСО (δ 2,54, <sup>1</sup>H) или метанолу (δ 3,34, <sup>1</sup>H), если не указано иное. Химические сдвиги указаны в м. д. (δ); мультиплетности обозначены s (синглет), d (дублет), t (триплет), q (квартет), quint, (квинтет), sext (секстет), m (мультиплет) и br (широкий). Константы взаимодействия, J, указаны в Герцах. Хроматографию на силикагеле проводили с использованием прибора Teledyne Isco CombiFlash® Rf + с использованием картриджей Hi-Purit Silica Flash (National Chromatography Inco) или картриджей RediSep Rf Gold C18 (Teledyne Isco). Аналитическую ВЭЖХ выполняли на Waters ACQUITY UPLC с детектором на фотодиодной матрице с использованием колонки Waters ACQUITY BEH Shield RPC18 (2,1×50 мм, 1,7 мкм). Аналитическую ЖХМС проводили на Waters ACQUITY UPLC с масс-детектором Waters 3100. Хиральную ВЭЖХ выполняли на приборе Waters Alliance e2695 с детектором на фотодиодной матрице с использованием колонок Daicel Chiralpak® AD-H, Chiralpak® IA, Chiralpak® IB, Chiralpak® IC, Chiralcel® OD-H или Chiralcel® OJ-H. Оптические вращения были получены на цифровом поляриметре Jasco P-2000 и представлены как [α]<sub>D</sub><sup>T</sup> температура (Т), концентрация (с=г/100 мл) и растворитель. Если не указано иное, использовали коммерчески доступные реагенты и растворители в том виде, в котором они были получены.

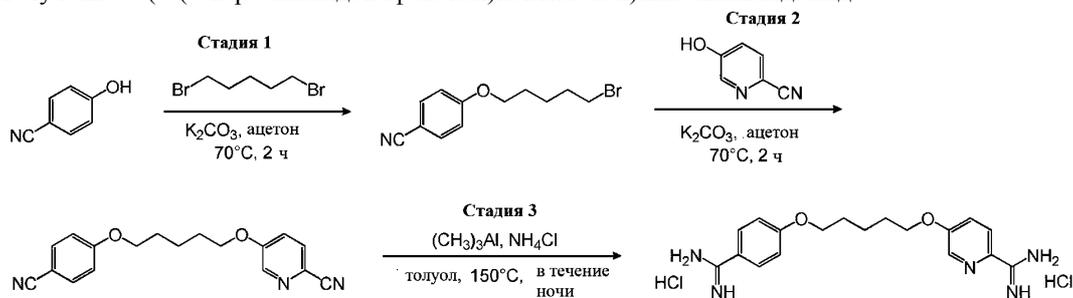
## Гетероарильные аналоги пентамидина

Соед. №	Структура	Название	Человек Норма микросом CL (мкл/мин./мг)
1		5-(5-(4-карбамимидоилфенокси)пентилокси)пиколинимидаמיד	13,6
5		5-(4-(4-карбамимидоилфенокси)бутоксипиколинимидаמיד	3,9
6		5-((4-(4-карбамимидоилфенокси)бут-2-ен-1-ил)окси)пиколинимидаמיד	8,1

13		5-(((1r, 4r)-4-(4-карбамимидоилфенокси)циклогексил)окси)пиколинимид амид	11
14		5-(((1s, 4s)-4-(4-карбамимидоилфенокси)циклогексил)окси)пиколинимид амид	15,3
16		5,5'-(бутан-1,4-диилбис(окси))дипиколинимид амид	4,6
17		5-(3-(4-карбамимидоилфенокси)пропокси)пиколинимид амид	8,1
18		5-{2-[(1R,3S)-3-[2-(4-карбамимидоилфенил)этил]циклогексил]этил} пиридин-2-карбоксимид амид	9,5

## Пример 1.

Получение 5-(5-(4-карбамимидоилфенокси)пентилокси)пиколинимид амида.



## Соединение 1.

## Стадия 1.

В перемешиваемый раствор 4-гидроксибензонитрила (10 г, 0,08 моль, 1 экв.) в ацетоне (120 мл) добавляли 1,5-дибромопентан (95,72 г, 0,42 моль, 5 экв.) и карбонат калия (23,21 г, 0,16 моль, 2 экв.), затем реакционную смесь перемешивали при 70°C в течение 2 ч. Реакционную смесь отслеживали посредством ТСХ-ЖХ-МС. Реакционную смесь разбавляли водой (500 мл) и экстрагировали с помощью EtOAc

(2×800 мл). Отделенный органический слой сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством стеклянной колонки с получением 4-((5-бромопентил)бензонитрила (15 г, 66,94%).

Аналитические данные.

ЖХ-МС: 268([M+1])<sup>+</sup>.

Стадия 2.

В перемешиваемый раствор 4-((5-бромопентил)бензонитрила (0,52 г, 4,33 ммоль, 1 экв.) в ацетоне (5 мл) добавляли соединение 5-гидроксипиколинонитрил (1,15 г, 4,33 ммоль, 1 экв.) и карбонат калия (1,19 г, 8,66 ммоль, 2 экв.) при 70°C в течение 2 ч. Реакционную смесь отслеживали посредством ТСХ и ЖХ-МС. Реакционную смесь разбавляли водой (80 мл) и экстрагировали с помощью EtOAc (400 мл). Отделенный органический слой сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством хроматографии на системе CombiFlash с получением 5-((5-(4-цианофенокси)пентил)окси)пиколинонитрила (0,6 г, 45,11%).

Аналитические данные.

ЖХМС: 308([M+1])<sup>+</sup>.

Стадия 3.

В перемешиваемую суспензию NH<sub>4</sub>Cl (0,27 г, 0,65 ммоль, 8 экв.) в толуоле (5 мл) при 0°C добавляли триметилалюминий (0,27 г, 5,21 ммоль, 8 экв.). Обеспечивали перемешивание реакционной смеси при 0°C в течение 10 мин. с последующим перемешиванием при к.т. в течение 15 мин. В этот раствор добавляли 5-((5-(4-цианофенокси)пентил)окси)пиколинонитрил (0,2 г, 0,65 ммоль 1 экв.) и обеспечивали перемешивание реакционной смеси при к.т. в течение 15 мин. Затем реакционную смесь перемешивали с обратным холодильником в течение 18 ч. Реакционную смесь охлаждали до к.т. и в нее метанол добавляли (5 мл) в условиях охлаждения льдом и обеспечивали перемешивание реакционной смеси при к.т. в течение 30 мин. Реакционную смесь разбавляли с помощью 1 н. HCl (20 мл) и промывали этилацетатом (20 мл). Водный слой подщелачивали с помощью 1 н. раствора NaOH (15 мл) и экстрагировали этанолэтилацетатом (20%, 3×20 мл). Отделенный органический слой сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали в вакууме с получением неочищенного продукта, который очищали посредством ВЭЖХ с обратной фазой с получением 5-(5-(4-карбамимидоилфенокси)пентилокси)пиколинимидамида в виде свободного основания. Материал свободного основания растворяли в 1,25 н. HCl в этаноле (5 мл). Удаление этанола при пониженном давлении обеспечивало твердое вещество, которое после лиофилизации обеспечивало белое твердое вещество 5-(5-(4-карбамимидоилфенокси)пентилокси)пиколинимидамид в виде соли дигидрохлорида (0,18 г, 84,68%).

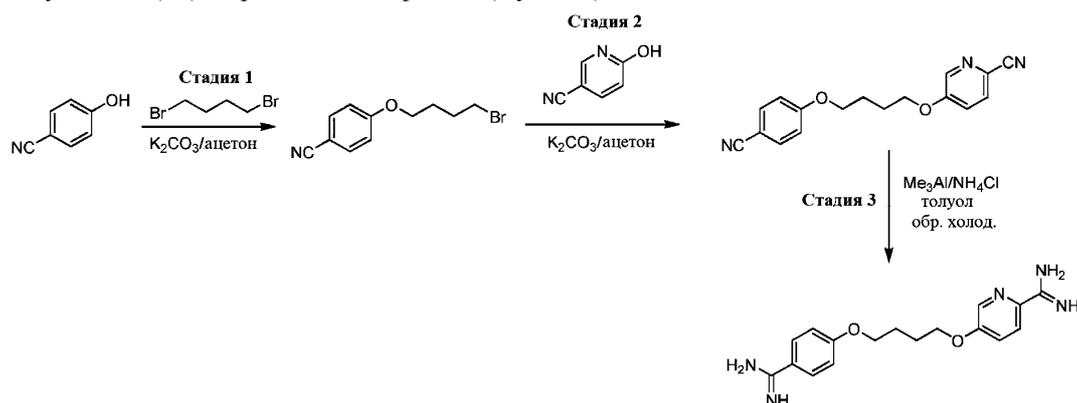
Аналитические данные.

ЖХМС: 342[M+1]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9,35 (с, 2H), 9,18 (с, 2H), 9,10 (с, 2H), 8,80 (с, 2H), 8,48 (с, 1H), 8,30 (д, 1H), 7,80 (д, 2H), 7,74 (д, 1H), 7,18 (д, 2H), 4,18 (т, 2H), 4,22 (т, 2H), 1,83 (м, 4H), 1,61 (м, 2H).

Пример 5.

Получение 5-(4-(4-карбамимидоилфенокси)бутоксипиколинимидамида.



Соединение 5.

Стадия 1.

В раствор 4-гидроксибензонитрила (1 г, 8,39 ммоль, 1 экв.) в ацетоне (10 мл) добавляли K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,32 г, 16,78 ммоль, 2 экв.) и 1,4-дибромобутан (7,25 г, 33,56 ммоль, 4 экв.) и обеспечивали перемешивание реакционной смеси с обратным холодильником в течение 2 ч. Ход реакции отслеживали посредством ТСХ. После поглощения исходного материала реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (2×200 мл). Объединенный органический слой промывали водой (3×50 мл), высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении. Полученный неочищенный материал очищали посредством Combi-Flash с использованием этилацетата-гексана с получением 4-(4-бромобутоксипиколинонитрила (1,5 г, 70,42%).

Аналитические данные.

ЖХМС: 255 [M+1]<sup>+</sup>.

Стадия 2.

В раствор 6-гидроксицианонитрила (0,2 г, 1,65 ммоль, 1 экв.) в ацетоне (10 мл) добавляли K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,57 г, 4,162 ммоль, 2,5 экв.) и 4-(4-бромобутокс)бензонитрил (0,50 г, 1,99 ммоль, 1,2 экв.) и обеспечивали перемешивание реакционной смеси при 70°C в течение 2 ч. Ход реакции отслеживали посредством ТСХ. Реакционную смесь охлаждали до к.т., разбавляли водой (150 мл) и обеспечивали перемешивание при к.т. в течение 10 мин. Осадок фильтровали и высушивали в вакууме с получением (0,3 г, 61,47%) 5-(4-(4-цианофенокс)бутокс)пиколинонитрила, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Аналитические данные.

ЖХМС: 294 [M+1]<sup>+</sup>.

Стадия 3.

В суспензию хлорида аммония (370 мг, 6,81 ммоль, 8 экв.) в толуоле (8 мл) добавляли триметилалюминий (3,41 мл, 6,81 ммоль, 8 экв.) по каплям при 0°C. Обеспечивали перемешивание смеси при такой же температуре в течение 10 мин, затем перемешивая при к.т. в течение 15 минут. В эту смесь добавляли 5-(4-(4-цианофенокс)бутокс)пиколинонитрил (250 мг, 0,85 ммоль) и обеспечивали перемешивание реакционной смеси при к.т. в течение 15 минут. Затем обеспечивали перемешивание реакционной смеси с обратным холодильником в течение 18 ч. Реакционную смесь охлаждали до к.т., разбавляли метанолом (5 мл) и обеспечивали перемешивание при к.т. в течение 30 минут. Реакционную смесь разбавляли с помощью 3 М водн. раствора HCl (25 мл) и промывали этилацетатом (20 мл). Водный слой подщелачивали с помощью 5 н. NaOH (20 мл) и экстрагировали раствором 1:5 смеси этанол-этилацетат (3×25 мл). Объемный органический слой сушили над безводным сульфатом натрия. Удаление растворителя обеспечивало неочищенное вещество, которое очищали посредством ВЭЖХ с обращенной фазой с получением 5-(4-(4-карбамимидоилфенокс)бутокс)пиколинимидамида в виде свободного основания. Твердое вещество растворяли в 1,25 М HCl (5 мл), раствор концентрировали в вакууме и лиофилизировали с получением 5-(4-(4-карбамимидоилфенокс)бутокс)пиколинимидамида в виде дисоли HCl (80 мг, 28,77%).

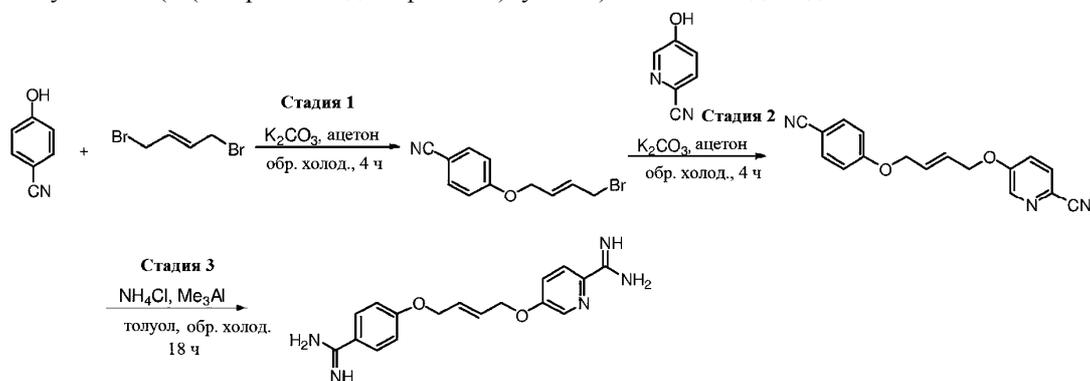
Аналитические данные.

ЖХМС 328 [M+1].

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9,41 (уш. с, 2H), 9,20 (уш. с, 2H), 9,16 (уш. с, 2H), 8,85 (уш. с, 2H), 8,46 (с, 1H), 8,32 (д, 1H), 7,82 (д, 2H), 7,71 (д, 1H), 7,18 (д, 2H), 4,20-4,28 (м, 2H), 4,10-4,19 (м, 2H), 1,85-1,96 (м, 4H).

Пример 6.

Получение 5-(4-(4-карбамимидоилфенокс)бутокс)пиколинимидамида.



Соединение 6.

Стадия 1.

В раствор 4-гидроксибензонитрила (1,0 г, 8,40 ммоль, 1 экв.) в ацетоне (20 мл) в инертной атмосфере добавляли последовательно K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,3 г, 16,80 ммоль, 2 экв.) и (E)-1,4-дибромбут-2-ен (5,4 г, 25,21 ммоль, 3 экв.) при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали при температуре флегмы в течение 4 ч. Ход реакции отслеживали посредством ТСХ. После завершения реакционную смесь разбавляли водой (200 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×300 мл), органический слой сушили над безводным сульфатом натрия. Удаление растворителя при пониженном давлении обеспечивало твердое вещество, которое растирали в порошок простым эфиром и пентаном до (E)-4-((4-бромобут-2-ен-1-ил)окс)бензонитрила (1,68 г, 80%).

Аналитические данные.

ЖХМС: 253 [M+1]<sup>+</sup>.

Стадия 2.

В раствор 5-гидроксицианонитрила (0,2 г, 1,66 ммоль, 1 экв.) в ацетоне (20 мл) в инертной атмосфере добавляли последовательно K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,46 г, 3,2 ммоль, 2 экв.) и (E)-4-((4-бромобут-2-ен-1-

ил)окси)бензонитрил (0,5 г, 1,99 ммоль, 0,5 экв.) при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали при температуре флегмы в течение 4 ч. Ход реакции отслеживали посредством ТСХ. После завершения реакцию смесь разбавляли водой (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×100 мл), органический слой сушили над безводным сульфатом натрия. Удаление растворителя при пониженном давлении обеспечивало твердое вещество, которое растирали в порошок простым эфиром и пентаном до (Е)-5-((4-(4-изоцианофенокси)бут-2-ен-1-ил)окси)пиколинонитрила (0,25 г, 51%).

Аналитические данные.

ЖХМС: 292 [M+1]<sup>+</sup>.

Стадия 3.

В суспензию хлорида аммония (0,54 г, 10,13 ммоль, 8 экв.) в толуоле (10 мл) добавляли триметилалюминий (5 мл, 10,13 ммоль, 8 экв.) по каплям при 0°C. Обеспечивали перемешивание смеси при такой же температуре в течение 10 мин, затем перемешивая при комнатной температуре в течение 15 минут. В эту смесь добавляли (Е)-5-((4-(4-изоцианофенокси)бут-2-ен-1-ил)окси)пиколинонитрил (0,37 г, 1,267 ммоль, 1 экв.) и обеспечивали перемешивание реакционной смеси при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем обеспечивали перемешивание реакционной смеси с обратным холодильником в течение 18 ч. Реакционную смесь охлаждали до к.т., разбавляли метанолом (5 мл) и обеспечивали перемешивание при к.т. в течение 30 мин. Реакционную смесь разбавляли с помощью 3 М водн. раствора HCl (20 мл) и промывали этилацетатом (20 мл). Водный слой подщелачивали с помощью 5 н. NaOH (15 мл) и экстрагировали этанолацетатом (20%, 3×50 мл). Объединенный органический слой сушили над безводным сульфатом натрия. Удаление растворителя обеспечивало неочищенное вещество, которое очищали посредством ВЭЖХ с обращенной фазой до 5-(4-(4-карбамимидоилфенокси)бутокси)пиколинимидамида в виде свободного основания. Твердое вещество растворяли в 1,25 М HCl (5 мл), раствор концентрировали в вакууме и лиофилизировали с получением 5-(4-(4-карбамимидоилфенокси)бутокси)пиколинимидамида в виде дисоли HCl (0,05 г, 12,07%).

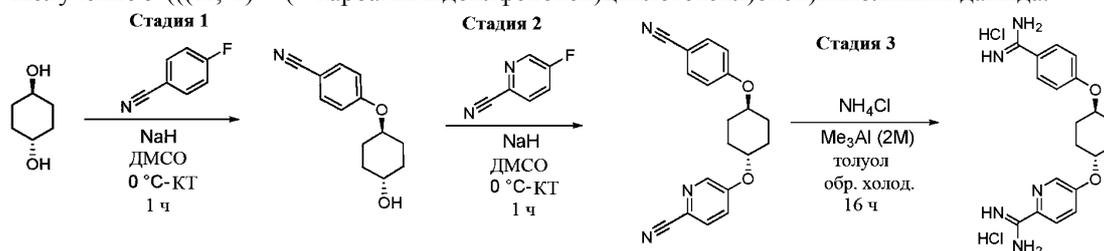
Аналитические данные.

ЖХМС: 326 [M+1].

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9,40 (уш. с, 2H), 9,08 (уш. с, 2H), 8,82 (уш. с, 2H), 8,53 (уш. с, 2H), 8,30 (д, 1H), 7,82 (д, 2H), 7,74 (д, 1H), 7,19 (д, 2H), 6,17 (уш. с, 2H), 4,82 (уш. с, 2H), 4,74 (уш. с, 2H).

Пример 13.

Получение 5-(((1r,4r)-4-(4-карбамимидоилфенокси)циклогексил)окси)пиколинимидамида.



Соединение 13.

Стадия 1.

В раствор транс-циклогексана-1,4-диола (1 г, 8,60 ммоль, 1,0 экв.) в ДМСО (10 мл) при 0°C добавляли NaH (60% в минеральном масле) (104 мг, 4,30 ммоль, 0,5 экв.) в инертной атмосфере и обеспечивали перемешивание полученной смеси при такой же температуре в течение 15 минут. В этот раствор добавляли 4-фторбензонитрил (522 мг, 4,30 ммоль, 0,5 экв.) в ДМСО (2 мл) и обеспечивали перемешивание полученной реакционной смеси при к.т. в течение 1 ч. Ход реакции отслеживали посредством ТСХ. После завершения реакцию смесь разбавляли ледяной водой (50 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×200 мл). Объединенный органический слой промывали водой (5×100 мл), затем соевым раствором (50 мл) и высушивали над безводным сульфатом натрия. Удаление растворителя при пониженном давлении обеспечивало неочищенный материал, который очищали посредством Combi-Flash на силикагеле с использованием системы этилацетат-гексан в качестве элюента с получением 4-(((1r,4r)-4-гидроксициклогексил)окси)бензонитрила (900 мг, 50%).

Стадия 2.

В раствор 4-(((1r,4r)-4-гидроксициклогексил)окси)бензонитрила (300 мг, 1,38 ммоль, 1,0 экв.) в ДМСО (5 мл) при 0°C в инертной атмосфере добавляли NaH (60% в минеральном масле) (49,68 мг, 2,07 ммоль, 1,5 экв.) и обеспечивали перемешивание полученной смеси при такой же температуре в течение 15 минут. В этот раствор добавляли раствор 5-фторпиколинонитрила (202,3 мг, 1,65 ммоль, 1,2 экв.) в ДМСО (2 мл) и обеспечивали перемешивание полученной реакционной смеси при к.т. в течение 1 ч. Ход реакции отслеживали посредством ТСХ. После завершения реакцию смесь разбавляли ледяной водой (50 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×150 мл). Объединенный органический слой промывали водой (5×100 мл), затем соевым раствором (50 мл) и высушивали над безводным сульфатом натрия. Удаление растворителя при пониженном давлении обеспечивало неочищенный материал, который очищали по-

средством Combi-Flash на силикагеле с использованием системы этилацетат-гексан в качестве элюента с получением 5-(((1r,4r)-4-(4-цианофенокси)циклогексил)окси)пиколинонитрила (200 мг, 45,35%).

Стадия 3.

В суспензию хлорида аммония (267,3 мг, 5,0 ммоль, 8 экв.) в толуоле (5 мл) добавляли триметилалюминий (2 М) (721 мг, 2,5 мл, 5,0 ммоль, 8 экв.) по каплям при 0°C. Обеспечивали перемешивание смеси при такой же температуре в течение 10 мин, затем перемешивая при к.т. в течение 15 минут. В эту смесь добавляли 5-(((1r,4r)-4-(4-цианофенокси)циклогексил)окси)пиколинонитрил (200 мг, 0,62 ммоль, 1,0 экв.) и обеспечивали перемешивание реакционной смеси при к.т. в течение еще 15 минут. Затем обеспечивали перемешивание реакционной смеси с обратным холодильником в течение 16 ч. Реакционную смесь охлаждали до к.т., разбавляли метанолом (5 мл) и обеспечивали перемешивание при к.т. в течение 30 минут. Реакционную смесь разбавляли с помощью 1 н. водн. раствора HCl (25 мл) и промывали этилацетатом (50 мл). Водный слой подщелачивали с помощью 5 н. NaOH (20 мл) и экстрагировали раствором 1:5 смеси этанол-этилацетат (3×50 мл). Объединенный органический слой сушили над безводным сульфатом натрия. Удаление растворителя обеспечивало неочищенный материал, который очищали посредством ВЭЖХ с обращенной фазой с получением 5-(((1r,4r)-4-(4-карбамимидоилфенокси)циклогексил)окси)пиколинимидамида в виде свободного основания. Твердое вещество растворяли в 1,25 М HCl в EtOH (5 мл) и раствор концентрировали в вакууме и лиофилизируют с получением соли дигидрохлорида 5-(((1r,4r)-4-(4-карбамимидоилфенокси)циклогексил)окси)пиколинимидамида (5 мг, 4,95%).

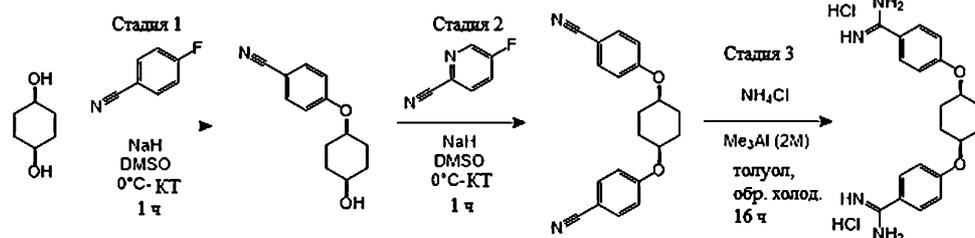
Аналитические данные.

ЖХМС: 354 [M+1]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,80 - 8,54 (м, 6H), 8,46 (д, 1H), 8,27 (д, 1H), 7,82 (д, 2H), 7,77 (д, 1H), 7,20 (д, 2H), 4,76 (уш. с, 1H), 4,69 (уш. с, 1H), 2,15-2,00 (м, 4H), 1,75-1,60 (м, 4H).

Пример 14.

Получение 5-(((1s,4s)-4-(4-карбамимидоилфенокси)циклогексил)окси)пиколинимидамида.



Соединение 14.

Стадия 1.

В раствор транс-циклогексан-1,4-диола (300 мг, 2,58 ммоль, 1,0 экв.) в ДМСО (5 мл) при 0°C в инертной атмосфере добавляли NaH (60% в минеральном масле) (30,98 мг, 1,29 ммоль, 0,5 экв.) и обеспечивали перемешивание полученной смеси при такой же температуре в течение 15 мин. В этот раствор добавляли раствор 4-фторбензонитрила (312,9 мг, 2,58 ммоль, 1,0 экв.) в ДМСО (2 мл) и обеспечивали перемешивание полученной реакционной смеси при к.т. в течение 1 ч. Ход реакции отслеживали посредством ТСХ. После завершения реакцию смесь разбавляли ледяной водой (50 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×200 мл). Объединенный органический слой промывали водой (5×100 мл), соевым раствором и высушивали над безводным сульфатом натрия. Удаление растворителя при пониженном давлении обеспечивало неочищенное вещество, которое очищали посредством Combi-Flash на силикагеле с использованием системы этилацетат-гексан в качестве элюента с получением 4-(((1s,4s)-4-гидроксициклогексил)окси)бензонитрила (200 мг, 71,4%).

Стадия 2.

В раствор 4-(((1s,4s)-4-гидроксициклогексил)окси)бензонитрила (180 мг, 0,82 ммоль, 1,0 экв.) в ДМСО (5 мл) при 0°C в инертной атмосфере добавляли NaH (60% в минеральном масле) (29,52 мг, 1,23 ммоль, 1,5 экв.) и обеспечивали перемешивание полученной смеси при такой же температуре в течение 15 минут. В эту смесь добавляли раствор 5-фторпиколинонитрила (121,4 мг, 0,99 ммоль, 1,2 экв.) в ДМСО (2 мл) и обеспечивали перемешивание полученной реакционной смеси при к.т. в течение 1 ч. Ход реакции отслеживали посредством ТСХ. После завершения реакцию смесь разбавляли ледяной водой (50 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×150 мл). Объединенный органический слой промывали водой (5×100 мл), соевым раствором и высушивали над безводным сульфатом натрия. Удаление растворителя при пониженном давлении обеспечивало неочищенное вещество, которое очищали посредством Combi-Flash на силикагеле с использованием системы этилацетат-гексан в качестве элюента с получением 5-(((1s,4s)-4-(4-цианофенокси)циклогексил)окси)пиколинонитрила (220 мг, 83,3%).

Стадия 3.

В суспензию хлорида аммония (294,2 мг, 5,5 ммоль, 8 экв.) в толуоле (6 мл) добавляли триметилалюминий (2 М) (793,1 мг, 2,75 мл, 5,5 ммоль, 8 экв.) по каплям при 0°C. Обеспечивали перемешивание смеси при такой же температуре в течение 10 мин, затем перемешивая при к.т. в течение 15 минут. В эту

смесь добавляли 5-(((1s,4s)-4-(4-цианофенокси)циклогексил)окси)пиколионитрил (220 мг, 0,68 ммоль, 1,0 экв.) и обеспечивали перемешивание реакционной смеси при к.т. в течение еще 15 минут. Затем обеспечивали перемешивание реакционной смеси с обратным холодильником в течение 16 ч. Реакционную смесь охлаждали до к.т., разбавляли метанолом (5 мл) и обеспечивали перемешивание при к.т. в течение 30 минут. Реакционную смесь разбавляли с помощью 1 н. водн. раствора HCl (25 мл) и промывали этилацетатом (50 мл). Водный слой подщелачивали с помощью 5 н. NaOH (20 мл) и экстрагировали раствором 1:5 смеси этанол-этилацетат (3×50 мл). Объединенный органический слой сушили над безводным сульфатом натрия. Удаление растворителя обеспечивало неочищенное вещество, которое очищали посредством ВЭЖХ с обращенной фазой с получением 5-(((1s,4s)-4-(4-карбамимидаилфенокси)циклогексил)окси)пиколинимидамида в виде свободного основания. Твердое вещество растворяли в 1,25 М HCl в EtOH (5 мл) и раствор концентрировали в вакууме и лиофилизировали с получением соли дигидрохлорида 5-(((1s,4s)-4-(4-карбамимидаилфенокси)циклогексил)окси)пиколинимидамида (5 мг, 4,95%).

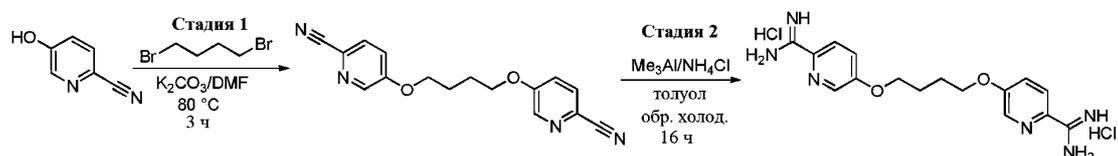
Аналитические данные.

ЖХМС: 354 [M+1]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11,33-10,49 (м, 6H), 8,48 (уш. с, 1H), 8,22 (уш. с, 1H), 7,81-7,74 (м, 3H), 7,19 (д, 2H), 2,00-1,75 (м, 8H).

Пример 16.

Получение 5,5'-(бутан-1,4-диилбис(окси))дипиколинимидамида.



Соединение 16.

Стадия 1.

В раствор 1,4-дибромобутана (500 мг, 2,31 ммоль, 1,0 экв.) в DMF (5 мл) добавляли K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (960 мг, 6,93 ммоль, 3,0 экв.) и 5-гидроксипиколионитрил (612,35 мг, 5,09 ммоль, 2,2 экв.) при к.т. Затем обеспечивали перемешивание реакционной смеси при 80°C в течение 3 ч. Ход реакции отслеживали посредством ТСХ. После завершения реакционную смесь разбавляли ледяной водой (50 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×200 мл). Объединенный органический слой промывали водой (5×50 мл), затем 1 н. раствором NaOH (3×30 мл), затем соевым раствором (50 мл) и высушивали над безводным сульфатом натрия. Удаление растворителя при пониженном давлении обеспечивало неочищенный материал, который очищали посредством Combi-Flash на силикагеле с использованием системы этилацетат-гексан в качестве элюента с получением 5,5'-(бутан-1,4-диилбис(окси))дипиколионитрила (250 мг, 36,7%).

Стадия 2.

В суспензию хлорида аммония (334,5 мг, 6,25 ммоль, 8,0 экв.) в толуоле (10 мл) добавляли триметилалюминий (2 М) (901,5 мг, 3,13 мл, 6,25 ммоль, 8,0 экв.) по каплям при 0°C. Обеспечивали перемешивание смеси при такой же температуре в течение 10 мин, затем перемешивая при к.т. в течение 15 мин. В эту смесь добавляли 5,5'-(бутан-1,4-диилбис(окси))дипиколионитрил (230 мг, 0,78 ммоль, 1,0 экв.) и обеспечивали перемешивание реакционной смеси при к.т. в течение еще 15 минут. Затем обеспечивали перемешивание реакционной смеси с обратным холодильником в течение 16 ч. Реакционную смесь охлаждали до к.т., разбавляли метанолом (5 мл) и обеспечивали перемешивание при к.т. в течение 30 мин. Реакционную смесь разбавляли с помощью 1 н. водн. раствора HCl (20 мл) и промывали этилацетатом (50 мл). Водный слой подщелачивали с помощью 5 н. NaOH (15 мл) и экстрагировали раствором 1:5 смеси этанол-этилацетат (5×80 мл). Объединенный органический слой сушили над безводным сульфатом натрия. Удаление растворителя обеспечивало неочищенный материал, который очищали посредством ВЭЖХ с обращенной фазой с получением 5,5'-(бутан-1,4-диилбис(окси))дипиколинимидамида в виде свободного основания. Твердое вещество растворяли в 1,25 М HCl в EtOH (5 мл) и раствор концентрировали в вакууме и лиофилизировали с получением 5,5'-(бутан-1,4-диилбис(окси))дипиколинимидамида дигидрохлорида (20 мг, 7,8%).

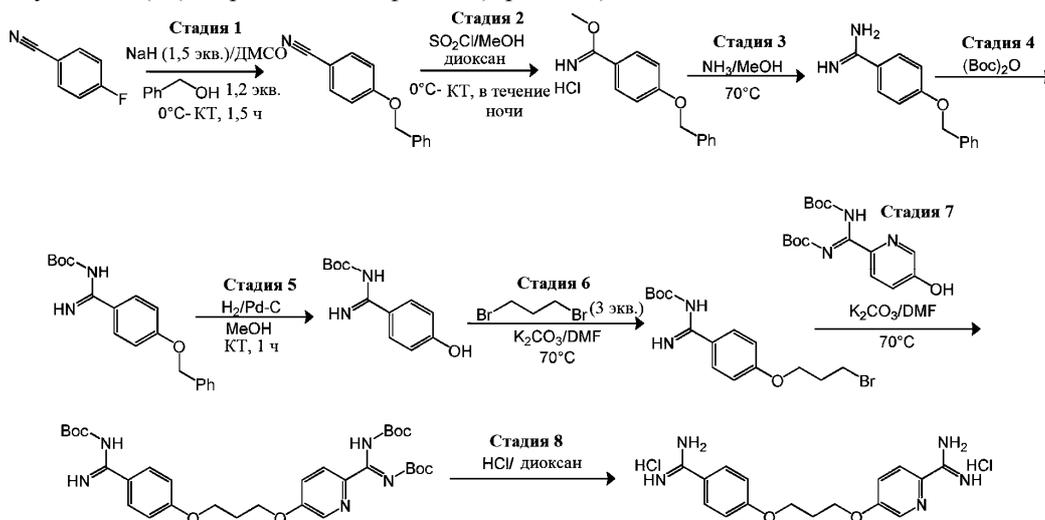
Аналитические данные.

ЖХМС: 329 [M+1]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9,40 (уш. с, 4H), 9,15 (уш. с, 1H), 8,49 (д, 2H), 8,30 (дд, 2H), 7,75 (дд, 2H), 4,26 (уш. с, 4H), 1,90 (уш. с, 4H).

## Пример 17.

Получение 5-(3-(4-карбамимидоилфенокси)пропокси)пиколинимидамида.



## Соединение 17.

## Стадия 1.

В перемешиваемый раствор бензилового спирта (5,35 г, 49,5 ммоль, 1,2 экв.) в ДМСО (30 мл) при 0°C добавляли гидрид натрия (1,28 г, 53,5 ммоль, 1,3 экв.) частями и полученную смесь перемешивали при такой же температуре в течение 15 минут. В эту смесь добавляли 4-фторбензонитрил (5 г, 41,2 ммоль, 1 экв.) и затем обеспечивали перемешивание реакционной смеси при комнатной температуре в течение 2 ч. Ход реакции отслеживали посредством ТСХ. После завершения реакционную смесь выливали в воду (200 мл) и осадок фильтровали и высушивали в вакууме с получением 4-(бензилокси)бензонитрила (6,97 г, 80%), который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

## Стадия 2.

В перемешиваемый раствор 4-(бензилокси)бензонитрила (6,9 г, 32,9 ммоль, 1 экв.) в растворе MeOH и диоксана (1:1, 80 мл) при 0°C добавляли тионилхлорид (39,23 г, 329,7 ммоль, 10 экв.) по каплям и обеспечивали перемешивание реакционной смеси при комнатной температуре в течение ночи. Ход реакции отслеживали посредством ТСХ. Реакционную смесь разбавляли диэтиловым эфиром (500 мл) и перемешивали в течение 15 минут. Осадок фильтровали и высушивали в вакууме с получением метил-4-(бензилокси)бензимидаата гидрохлорида (5 г, 62%), который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

## Стадия 3.

В перемешиваемый раствор метил-4-(бензилокси)бензимидаата гидрохлорида (5 г, 20,7 ммоль, 1 экв.) в метаноле (100 мл) добавляли 7 М аммоний в метаноле (50 мл) и обеспечивали перемешивание реакционной смеси при 70°C в течение 2 ч. Ход реакции отслеживали посредством ТСХ. Затем метанол полностью выпаривали при пониженном давлении с получением 4-(бензилокси)бензимидамида (4,4 г, 94%), который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

## Стадия 4.

В перемешиваемый раствор 4-(бензилокси)бензимидамида (2 г, 8,8 ммоль, 1 экв.) в ТГФ (30 мл) добавляли раствор гидроксида натрия (1,05 г, 26,5 ммоль, 3 экв.) в воде (10 мл), затем Вос-ангидрид (5,78 г, 26,5 ммоль, 3 экв.) и обеспечивали перемешивание реакционной смеси при комнатной температуре в течение 1 ч. Ход реакции отслеживали посредством ТСХ. После завершения реакционную смесь разбавляли водой (50 мл) и экстрагировали с использованием этилацетата (3×50 мл). Объединенный органический слой промывали солевым раствором (20 мл), высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали в вакууме с получением неочищенного материала, который очищали посредством Combi-Flash на силикагеле с использованием системы этилацетат-гексан в качестве элюента с получением трет-бутил(4-(бензилокси)фенил)(имино)метилкарбамата (1,5 г, 71%).

## Стадия 5.

В перемешиваемый раствор трет-бутил(4-(бензилокси)фенил)(имино)метилкарбамата (1,5 г, 4,6 ммоль, 1 экв.) в метаноле (100 мл) добавляли Pd-C (300 мг) и обеспечивали перемешивание реакционной смеси в атмосфере водорода в течение 1 ч. Ход реакции отслеживали посредством ТСХ. После завершения реакционную смесь фильтровали через слой целита и промывали метанолом (30 мл). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением трет-бутил(4-гидроксифенил)(имино)метилкарбамата (1,3 г, 86%), который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

## Стадия 6.

В перемешиваемый раствор трет-бутил(4-гидроксифенил)(имино)метилкарбамата (0,500 г, 2,1 ммоль,

1 экв.) и 1,3-дибромпропана (1,28 г, 6,3 ммоль, 3 экв.) в ацетоне (15 мл) добавляли карбонат калия (0,434 г, 3,1 ммоль, 1,5 экв.) и обеспечивали перемешивание реакционной смеси при 60°C в течение 2 ч. Ход реакции отслеживали посредством ТСХ. После завершения твердое вещество удаляли посредством фильтрации и фильтрат концентрировали с получением масляного неочищенного материала, который очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле с получением трет-бутил(4-(3-бромпропокси)фенил)(имино)метилкарбамата (340 мг, 45%).

#### Стадия 7.

В перемешиваемый раствор (Z)-трет-бутил(5-гидроксипиридин-2-ил)метандиилидендикарбамата (0,280 мг, 0,8 ммоль, 1 экв.) и трет-бутил(4-(3-бромпропокси)фенил)(имино)метилкарбамата (325 мг, 0,9 ммоль, 1,1 экв.) в DMF (10 мл) добавляли карбонат калия (0,331 мг, 2,4 ммоль, 3 экв.) и обеспечивали перемешивание реакционной смеси при 60°C в течение 2 ч. Ход реакции отслеживали посредством ТСХ. После завершения реакцию смесь разбавляли водой (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×50 мл). Объединенный органический слой промывали водой (5×50 мл), затем соевым раствором (20 мл) и высушивали над безводным сульфатом натрия. Удаление растворителя при пониженном давлении обеспечивало неочищенный материал, который очищали посредством Combi-Flash на силикагеле с получением трибок-5-(3-(4-карбамимидоилфеноксипропокси)пиколинимидамида (350 мг, 69%).

#### Стадия 8.

Раствор трибок-5-(3-(4-карбамимидоилфеноксипропокси)пиколинимидамида (0,350 мг, 0,5 ммоль, 1 экв.) в 4 М растворе HCl в диоксане перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч. Ход реакции отслеживали посредством <sup>1</sup>H ЯМР. После завершения реакцию смесь растирали в порошок этилацетатом, фильтрат отделяли и высушивали в вакууме с получением 5-(3-(4-карбамимидоилфеноксипропокси)пиколинимидамида дигидрохлорида (152 мг, 85%).

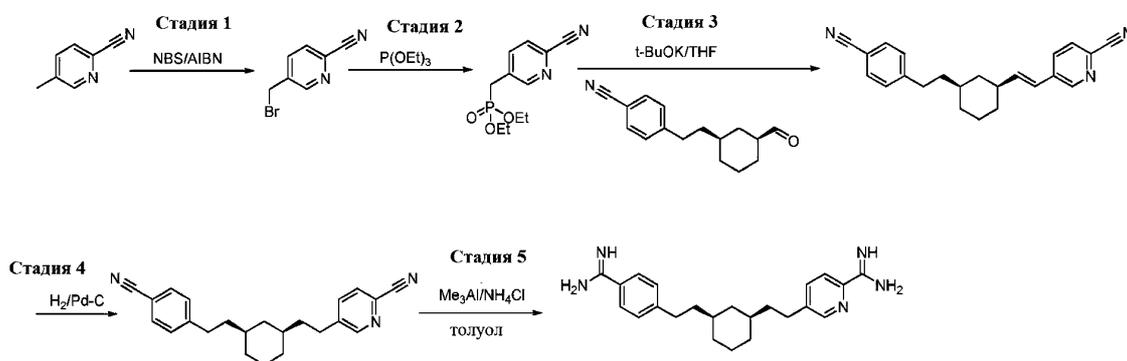
Аналитические данные.

ЖХМС 313,15 [M+1]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ м. д. 9,40 (brs., 2H) 9,15 (уш. с, 2H) 9,20 (уш. с, 2H) 8,91 (уш. с, 2H) 8,51 (д, 1H) 8,33 (д, 1H) 7,84 (д, 2H) 7,76 (дд, 1H) 7,18 (м, 2H) 4,37 (т, 2H) 4,28 (т, 2H) 2,24 - 2,31 (м, 2H).

#### Пример 18.

Получение 5-{2-[(1R,3S)-3-[2-(4-карбамимидоилфенил)этил]циклогексил]этил}пиридин-2-карбоксимидамида.



#### Соединение 18.

##### Стадия 1.

В раствор 5-метилпиколионитрила (5 г, 42,30 ммоль, 1,0 экв.) в CHCl<sub>3</sub> (80 мл) добавляли AIBN (3,47 г, 21,15 ммоль, 0,5 экв.), затем NBS (15,05 г, 84,60 ммоль, 2,0 экв.) при к.т. и обеспечивали перемешивание смеси при 50°C в течение 3 ч. Ход реакции отслеживали посредством ТСХ. После завершения реакцию смесь разбавляли водой (150 мл) и экстрагировали дихлорметаном (3×300 мл). Объединенный органический слой промывали соевым раствором и высушивали над безводным сульфатом натрия. Удаление растворителя при пониженном давлении обеспечивало неочищенное вещество, которое очищали посредством Combi-Flash на силикагеле с использованием системы этилацетат-гексан в качестве элюента с получением 5-(бромометил)пиколионитрила (2,5 г, 30%) в виде коричневого твердого вещества.

##### Стадия 2.

Смеси 5-(бромометил)пиколионитрила (2,5 г, 12,69 ммоль, 1,0 экв.) и триэтилфосфита (2,7 мл, 15,22 ммоль, 1,2 экв.) обеспечивали перемешивание при 140°C в течение 4 ч. Ход реакции отслеживали посредством ТСХ. После завершения реакцию смесь разбавляли ледяной водой (150 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×200 мл). Объединенный органический слой промывали соевым раствором (100 мл) и высушивали над безводным сульфатом натрия. Удаление растворителя при пониженном давлении обеспечивало неочищенное вещество, которое очищали посредством Combi-Flash на силикагеле с использованием системы этилацетат-гексан в качестве элюента с получением диэтил-(6-цианопиридин-3-ил)метилфосфоната (2,5 г, 83%) в виде вязкой жидкости.

## Стадия 3.

В перемешиваемый раствор диэтил-(6-цианопиридин-3-ил)метилфосфоната (0,316 г, 1,24 ммоль, 1,5 экв.) в ТГФ (10 мл) при 0°C добавляли 1 М раствор трет-бутоксид калия в ТГФ (1,24 мл, 1,24 ммоль, 1,5 экв.) по каплям и обеспечивали перемешивание реакционной смеси при такой же температуре в течение 15 мин. В этот раствор добавляли раствор 4-(2-((1S,3S)-3-формилциклогексил)этил)бензонитрила (0,2 г, 0,828 ммоль, 1 экв.) в ТГФ (5 мл) и обеспечивали перемешивание реакционной смеси при к.т. в течение 45 минут. Ход реакции отслеживали посредством ТСХ. После завершения реакцию смесь разбавляли водн. раствором хлорида аммония (40 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×50 мл). Объединенный органический слой промывали солевым раствором (20 мл), высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного материала, который очищали посредством Combi-Flash на силикагеле с использованием системы этилацетат-гексан в качестве элюента с получением 5-((E)-2-((1S,3S)-3-(4-цианофенетил)циклогексил)винил)пиколинонитрила (0,180 г, 63,8%).

## Стадия 4.

В раствор 5-((E)-2-((1S,3S)-3-(4-цианофенетил)циклогексил)винил)пиколинонитрила (0,130 г, 0,380 ммоль, 1 экв.) в метаноле (20 мл) добавляли Pd-C (7 мг). Обеспечивали перемешивание реакционной смеси при к.т. в атмосфере водорода в течение 25 минут. Ход реакции отслеживали посредством ТСХ и <sup>1</sup>H ЯМР. После завершения реакцию смесь фильтровали через слой целита и слой промывали метанолом (20 мл). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением 5-(2-((1R,3S)-3-(4-цианофенетил)циклогексил)этил)пиколинонитрила (100 мг), который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

## Стадия 5.

В суспензию NH<sub>4</sub>Cl (161 мг, 3,02 ммоль, 8 экв.) в толуоле (5 мл) при 0°C добавляли 2 М триметилалюминий в толуоле (1,5 мл, 3,02 ммоль, 8 экв.) по каплям и обеспечивали перемешивание смеси при такой же температуре в течение 15 минут. Смесь доводили до к.т. и обеспечивали перемешивание еще 10 мин. В эту смесь добавляли раствор 5-(2-((1R,3S)-3-(4-цианофенетил)циклогексил)этил)пиколинонитрил (130 мг, 0,378 ммоль, 1 экв.) растворяли в толуоле (5 мл) и обеспечивали перемешивание реакционной смеси при к.т. в течение более 10 мин и затем обеспечивали перемешивание при 120°C в течение 18 ч. Реакционную смесь охлаждали до к.т., разбавляли метанолом (5 мл) и обеспечивали перемешивание при к.т. в течение 15 минут. Реакционную смесь разбавляли 3 М водн. HCl (15 мл) и промывали этилацетатом (30 мл). Водный слой подщелачивали с помощью 3 М водн. раствора NaOH и экстрагировали 20% раствором этанола-этилацетата (3×50 мл). Объединенный органический слой сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме с получением неочищенного материала, который очищали посредством ВЭЖХ с обращенной фазой с получением необходимого продукта в виде свободного основания. Твердое вещество растворяли в 1,25 М HCl в этаноле (3 мл) и концентрировали с получением твердого вещества, которое лиофилизировали с получением необходимого соединения в виде дисоли HCl (20 мг, 11,7%).

Аналитические данные.

ЖХМС: 378,3 [M+1]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CD<sub>3</sub>OD) δ 8,68 (д, 1H) 8,10 (д, 1H) 7,94 (дд, 1H) 7,73 (д, 2H) 7,45 (д, 2H) 2,85 - 2,70 (м, 4H) 1,95 - 1,75 (м, 4H), 1,70 - 1,50 (м, 4H), 1,40 -1,20 (м, 4H) 1,00 -0,77 (м, 2H).

Пример 20. Цитотоксичность соединений аналогов пиридинила.

Целью этого исследования является изучение потенциального действия соединений 1-15 по уничтожению клеток на 3 линиях раковых клеток. Концентрация 50% ингибирования (IC<sub>50</sub>) была определена для этих соединений в различных линиях раковых клеток с использованием анализа жизнеспособности люминесцентных клеток CellTiter-Glo™ при различных концентрациях соединения. Каждую линию клеток (например, NCI-H209; NCI-H69 и SW1271) обрабатывали соединениями 1-15 и культуральная среда содержит 0,2% [об./об.] контрольного носителя ДМСО. Все клетки культивировали в среде с добавлением 10-20% фетальной бычьей сыворотки при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. IC<sub>50</sub> значений против NCI-H209; NCI-H69; и линии клеток SW1271 показаны в табл. 2 ниже.

Таблица 2

Соединение №	IC <sub>50</sub> соединений 1-15		
	IC <sub>50</sub> (мкМ) [NCI-H209]	IC <sub>50</sub> (мкМ) [NCI-H69]	IC <sub>50</sub> (мкМ) [SW1271]
1	1,7	0,858	N/A
5	2,78	0,876	N/A
6	3,48	1,07	0,455
13	N/A	2,11	N/A
14	N/A	1,1	N/A

\*N/A, не определено

Пример 21. Цитотоксичность соединений пиридинила.

Целью этого исследования является изучение действия соединения 1 на цитотоксичность в отношении 61 различных типов линий раковых клеток. Значения  $IC_{50}$  были получены с использованием CellTiter-Glo™, как описано выше. Каждую линию клеток, показанную в табл. 3, обрабатывали соединением 1, стандартным химиотерапевтическим лекарственным средством, цисплатином, в качестве исходного контроля, а культуральная среда содержала 0,2% [об./об.] контрольного носителя ДМСО. Все линии раковых клеток культивировали в среде с добавлением 10-20% фетальной бычьей сыворотки при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. В табл. 3 показаны значения  $IC_{50}$  соединения 1 против различных типов рака печени, холангиокарциномы, рака желчного пузыря, рака почек, рака простаты, рака легкого, рака мозга, рака яичников, рака желудка, рака толстой кишки и рака костей.

Таблица 3

Цитотоксичность соединения 1 ( $IC_{50}$ )

Название клеточной линии	Тип	$IC_{50}$ (мкМ)
HCCC-9810	Внутрипеченочная холангиокарцинома	0,71
HCCLM3	Гепатоцеллюлярная карцинома	12,16
Hep G2	Гепатобластома	0,34
Hep G2/C3A	Гепатобластома	0,23
Hep3B	Гепатоцеллюлярная карцинома	0,28
HLE	Гепатоцеллюлярная карцинома	0,59
HLF	Гепатоцеллюлярная карцинома	2,04
HuCC1	Внутрипеченочная холангиокарцинома	8,01
HUH-1	Гепатоцеллюлярная карцинома	3,2
HUH-6 CLONE5	Гепатобластома	0,86
HUH-7	Гепатоцеллюлярная карцинома	0,97
JHH-1	Гепатоцеллюлярная карцинома	3,87
JHH-4	Гепатоцеллюлярная карцинома	1,27
JHH-5	Гепатоцеллюлярная карцинома	0,65
JHH-6	Гепатоцеллюлярная карцинома	0,38
JHH-7	Гепатоцеллюлярная карцинома	0,5
Li-7	Гепатоцеллюлярная карцинома	0,76
MHCC97-H	Гепатоцеллюлярная карцинома	8,31
NOZ	Карцинома желчного пузыря	2,54
OCUG-1	Карцинома желчного пузыря	2,89
OZ	Внутрипеченочная холангиокарцинома	9,39
PLC/PRF/5	Гепатоцеллюлярная карцинома	4,13
RBE	Внутрипеченочная холангиокарцинома	1,4
SK-HEP-1	Гепатоцеллюлярная карцинома	4,72
SNU-354	Гепатоцеллюлярная карцинома	0,84
SNU-368	Гепатоцеллюлярная карцинома	0,36
SNU-387	Гепатоцеллюлярная карцинома	4
SNU-398	Гепатоцеллюлярная карцинома	0,22
SNU-423	Гепатоцеллюлярная карцинома	1,75
SNU-449	Гепатоцеллюлярная карцинома	1,57

SNU-475	Гепатоцеллюлярная карцинома	1,25
SNU-739	Гепатоцеллюлярная карцинома	2,23
SNU-761	Гепатоцеллюлярная карцинома	3,31
786-O	Почечно-клеточная карцинома	9,63
769-P	Почечно-клеточная карцинома	1,63
A498	Почечно-клеточная карцинома	1,17
ACHN	Папиллярный рак почки	4,64
Caki-2	Папиллярный рак почки	4,18
OS-RC-2	Почечно-клеточная карцинома	1,7
SK-NEP-1	Саркома Юинга	1,93
SW 156	Почечно-клеточная карцинома	6,28
UO.31	Почечно-клеточная карцинома	3,47
Caki-1	Светлоклеточная почечно-клеточная карцинома	3,42
клон LNCaP FGC	Карцинома предстательной железы	1,78
OVCAR-3	Низкодифференцированная серозная аденокарцинома яичников	1,96
SK-OV-3	Серозная цистаденокарцинома яичников	1,17
A549	Аденокарцинома легкого	0,37
NCI-H460	Крупноклеточная карцинома легкого	0,52
NCI-H1975	Аденокарцинома легкого	2,66
LN-229	Глиобластома	1,6
SF268	Астроцитомы	0,75
U-87 MG	Глиобластома	5,58
MKN45	Аденокарцинома желудка	0,64
DLD-1	Аденокарцинома толстой кишки	3,11
HCT 116	Карцинома толстой кишки	2,67
BT-474	Инфильтративно-протоковая карцинома	15,68
DU4475	Карцинома груди	0,24
HCC1954	Протоковая карцинома молочной железы	2,71
MCF7	Инфильтративно-протоковая карцинома	0,93
ZR-75-1	Инфильтративно-протоковая карцинома	1,32
Saos-2	Остеосаркома	2,39

#### Клеточные линии печени

Целью этого исследования является изучение воздействия соединения 1 на жизнеспособность клеток при различных типах рака печени. В исследовании использовали десять (10) различных клеточных линий рака печени. Каждую линию клеток печени, показанную в табл. 4, обрабатывали соединением 1, пентамидином, в качестве контрольного образца, подставка для ухода (цисплатин) и культуральная среда содержала 0,2% [об./об.] контрольного носителя ДМСО и значения  $IC_{50}$  получали, как описано выше.

Значения исходных данных из анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo™, выраженные в относительных единицах люминесценции, были нормализованы к носителю для каждого отдельного планшета, и любое снижение люминесценции указывало на снижение жизнеспособности (%). Данные анализировали в GraphPad PRISM с использованием нелинейного сигмоидального графика с переменным наклоном (асимметричная четырехточечная линейная регрессия) и получали значение IC<sub>50</sub> для каждого соединения. В эксперименте тестировали пентамидин, соединение 1 и стандартный контрольный препарат, цисплатин, в среде полного развития в течение 8 дней. Клетки первоначально обрабатывали тестируемыми соединениями в день 0, а затем клетки пополняли свежими разведенными соединениями в день 3. Пентамидин, соединение 1 и цисплатин тестировали в 9 точках концентрации: 100, 33,33, 11,11, 3,70, 1,23, 0,41, 0,14, 0,05 и 0,02 мкМ (конечная концентрация ДМСО = 0,5%). Был проведен один независимый эксперимент, и значения IC<sub>50</sub> суммированы в табл. 4 ниже. В частности, значения IC<sub>50</sub> пентамидаина и соединения 1 составляли 0,8 и 0,6 мкМ в Hep3B-luc соответственно. Значение IC<sub>50</sub> для цисплатина составляло 5,1 мкМ, что согласуется с более ранними данными.

Таблица 4

IC <sub>50</sub> линий клеток печени			
Название	клеточной	Пентамидин	Соединение 1 (IC <sub>50</sub> )
линии		(IC <sub>50</sub> )	
Hep3B-luc (IC <sub>50</sub> мкМ)		0,8	0,6
HCCLM3 (IC <sub>50</sub> мкМ)		6,9	9,65
Hep3B (IC <sub>50</sub> мкМ)		0,16	0,18
HepG2 (IC <sub>50</sub> мкМ)		0,29	0,31
HUH1 (IC <sub>50</sub> мкМ)		1,79	2,95
HUH7 (IC <sub>50</sub> мкМ)		0,68	0,53
MHCC97H (IC <sub>50</sub> мкМ)		4,26	5,32
SK-HEP-1 (IC <sub>50</sub> мкМ)		1,45	1,4
HEP3B2.7-1 (IC <sub>50</sub> мкМ)		0,28	0,32
SK-HEP-1 (IC <sub>50</sub> мкМ)		0,72	0,63

Кроме того, IC<sub>50</sub> соединение 5 также оценивали в аналогичном эксперименте и оно продемонстрировало сильную цитотоксичность в отношении линий клеток печени, как показано в табл. 5.

Таблица 5

IC <sub>50</sub> соединений 4, 5 и 19			
Название	клеточной	Соед. 5	
линии		(IC <sub>50</sub> мкМ)	
HEP3B2.7-1 (IC <sub>50</sub> мкМ)		0,207	
SK-HEP-1 (IC <sub>50</sub> мкМ)		0,73	

Пример 22. Ортопический анализ печени *in vivo*.

В этом исследовании терапевтический эффект соединения 1 *in vivo* на рак печени оценивали на ортопической модели мышей с использованием клеточной линии Hep3B2.1-7-Luc. Три группы ортопической модели на бестимусных мышцах BALB/c получали носитель, соединение 1 в дозе 10 мг/кг и соединение 1 в дозе 20 мг/кг перорально (п/о) раз в 3 суток в течение недели, далее каждый день в течение трех недель. Результаты общего потока, измеренного в единицах фотонов/с/10<sup>6</sup> в трех группах, показаны на фиг. 1. Средний общий поток (фотонов/с/10<sup>6</sup>) мышей в контрольной группе носителя достиг 1223,01 фотонов/с/10<sup>6</sup> в день 28 после группировки. Средний общий поток (фотонов/с/10<sup>6</sup>) составлял 464,74 и 306,74 для группы соединения 1 (10 мг/кг) и группы соединения 1 (20 мг/кг) на 28 день после группировки. По сравнению с группой носителя, группа соединения 1 (10 мг/кг) показала значительный противоопухолевый эффект на день с 8 по 18 и день 28; группа соединения 1 (20 мг/кг) показала значительный противоопухолевый эффект с 8 по 28 день (фиг. 1). Соединение 1 хорошо переносилось группами как 10 мг/кг, так и 20 мг/кг без явной потери массы тела. Обе группы соединения 1 стабильно набирали массу тела до 28 дня, тогда как мыши в группе, получавшей носитель, демонстрировали потерю веса на 28 день. Масса всей печени (с опухолью) показана в табл. 7 и на фиг. 2.

Таблица 7

Масса всей печени (с опухолью) мышей в разных группах лечения			
№ животного	Масса всей печени (с опухолью) (г)		
	Носитель	Соединение 1 10 мг/кг	Соединение 1 20 мг/кг
1	1,866	1,817	1,610
2	2,206	2,019	1,603
3	1,933	2,311	2,260
4	3,258	1,334	1,681
5	2,015	2,415	2,243
6	2,966	2,602	1,645
7	3,397	2,280	2,012
8	2,123	3,035	1,926

Размеры опухолей (обозначенные интенсивностью сигнала) в группе соединения 1 (10 мг/кг) показали значительную разницу на 25-й день и чрезвычайно значительную разницу на 28-й день; и размеры опухолей в соединении 1 (20 мг/кг) показали чрезвычайно значительную разницу в период с 22 по 28 день по сравнению с таковой в контрольной группе носителя на основе двухфакторного дисперсионного анализа и пост-критерия Бонферрони.

Размеры опухолей в группе соединения 1 (10 мг/кг) не показали значительных различий в течение дней лечения; и размеры опухолей в соединении 1 (20 мг/кг) показали значительную разницу на 28 день и чрезвычайно значительную разницу на 25 день по сравнению с таковой в контрольной группе носителя на основании статистических анализов с использованием непараметрического дисперсионного анализа с последующим критерием Краскела-Уоллиса.

Однофакторный дисперсионный анализ в сочетании с пост-критерием Даннета был проведен для сравнения результатов химического состава крови, полученного из сыворотки крови (включая ALT, AST, ALP, TP, ALB, UA, UREA, Glu, TC, TG, Ca, Mg, P, CK, LDH, GLB, A/G и CREA) среди групп носителя и получения лечения. Непараметрический дисперсионный анализ с пост-критерием Краскела-Уоллиса был проведен для сравнения химического состава крови, полученной из сыворотки крови (включая ALT, AST и ALP), среди групп носителя и получения лечения. Обе группы лечения (10 мг/кг и 20 мг/кг) показали значительное снижение уровней маркеров травмы/повреждения печени, т.е., ALT и AST, в зависимости от дозы, что позволяет предположить, что лечение соединением 1 улучшало функцию печени за счет уменьшения опухолевой нагрузки в печени (фиг. 4).

Подводя итог, можно сказать, что соединение 1 хорошо переносилось при обоих испытанных уровнях доз. Кроме того, соединение 1 в дозе 20 мг/кг показало значительную *in vivo* противоопухолевую активность против ортотопической модели печени Нер3В2. 1-7-Лус у бестимусных мышей BALB/c на 25 и 28 день (фиг. 1-4).

Пример 23. Переносимость соединения 1 у бестимусных мышей BALB/c Целью этого исследования является оценка переносимости соединения 1 у мышей, не несущих опухоль, у бестимусных мышей BALB/c. Воздействие соединения 1 в плазме крови, печени, почках, толстой кишке и мочевом пузыре, а также химический состав крови, полученной из сыворотки крови, были протестированы.

#### Материалы

Тридцать шесть (36) самок бестимусных мышей BALB/c в возрасте 6-8 недель с массой тела около 19-23 г содержались в отдельных вентиляционных клетках при постоянной температуре (20~26°C) и влажности (40-70%) с 3 животными в клетке. Животные имели свободный доступ к облученному стерилизованному сухому гранулированному корму и стерильной питьевой воде в течение всего периода исследования. Подробная информация о плане исследования представлена в табл. 8.

План исследования

Группа	Лечение	№*	Уровень дозы	Путь введения дозы	Схема введения доз
			(мг/кг)		
1	Носитель	6	-	П/О	Ежедневно*21
2	Соединение 1	6	5	П/О	Ежедневно*21
3	Соединение 1	6	10	П/О	Ежедневно*21
4	Соединение 1	6	10	П/О	Раз в 2 суток*21
5	Соединение 1	6	20	П/О	Ежедневно*21
6	Соединение 1	6	40	П/О	Ежедневно*21

Примечание: N\*: номер животного; П/О, внутрь (пероральное введение, п/о.)

После группировки животных ежедневно проверяли на заболеваемость и смертность. Во время обычного наблюдения у животных определяли любое влияние на поведение, такое как подвижность, потребление пищи и воды, прибавка/потеря массы тела. Массы тела измеряли ежедневно. Регистрировали смерть и другие клинические признаки.

Животных из каждой группы тестировали, и образцы собирали в двух разных точках времени для анализа химического состава крови, а также определения концентрации соединения в плазме крови, почках, печени, толстой кишке и мочевом пузыре. Первый отбор образцов проводился непосредственно перед последней дозой (0 ч.) на 21 день; и второй отбор образцов был проведен через 1 час после последней дозы (1 час) на 21 день. Ниже приведены подробные описания методов отбора проб.

Сбор сыворотки крови. Собирали около 500 мкл крови в пробирку объемом 1,5 мл. Все образцы помещали в комнатную температуру на 30 минут перед центрифугированием, затем кровь центрифугировали при 6000 об./мин., 4°C в течение 5 минут для получения сыворотки. Образцы сыворотки переносили в морозильники при -80°C для хранения для обычного анализа крови.

Сбор плазмы крови: собрали около 200 мкл крови в пробирку объемом 1,5 мл, содержащую антикоагулянт - 2К-ЭДТА для плазмы крови. Плазму крови переносили в морозильники при -80°C для хранения для анализа воздействия.

Сбор почки. Левую почку каждой мыши собирали, взвешивали и замораживали в сухом льду, а затем переносили в морозильники при -80°C для хранения для анализа воздействия. Правую почку фиксировали в нейтральном формалине в течение 24 ч, затем в 70% EtOH для заливки парафином и окрашивания гематоксилином и эозином анализа изображений.

Сбор печени. Левая доля печени у каждой мыши была собрана и разделена на две части. Одну часть взвешивали и замораживали в сухом льду, а затем переносили в морозильники при -80°C для хранения для дальнейшего анализа воздействия. Другую часть фиксировали в нейтральном формалине в течение 24 ч, затем в 70% EtOH для заливки парафином, окрашивания гематоксилином и эозином и анализа изображений.

Сбор толстой кишки: собирали всю толстую кишку и затем вручную перфузировали всю толстую кишку холодным раствором ФСБ для удаления фекального материала. Наконец, поперечно открыли толстую кишку и осторожно промокнули ее. Собирали всю толстую кишку каждой мыши, взвешивали и замораживали в сухом льду, а затем переносили в морозильники с температурой -80°C для хранения. Всю толстую кишку из группы 5 (соединение 1, 20 мг/кг, п/о. ежедневно\*21 группа) хранили для анализа воздействия.

Сбор мочевого пузыря. Мочевой пузырь каждой мыши собирали, взвешивали и замораживали в сухом льду, а затем переносили в морозильники при -80°C для хранения. Мочевой пузырь из группы 5 (соединение 1, 20 мг/кг, п/о ежедневно\*21) хранили для биологического анализа для анализа воздействия. TBD для других.

#### Результаты

Изменение массы тела мышей и процент относительного изменения массы тела (RCBW) показаны на фиг. 5 и 6. В целом, соединение 1 хорошо переносилось без явной потери массы тела, наблюдаемой в группах с 5 мг/кг раз в сутки, 10 мг/кг раз в сутки, 10 мг/кг раз в 2 суток и 20 мг/кг раз в сутки, но масса тела в соединении 1 (40 мг/кг раз в сутки) была ниже статистически значимо на 20 и 21 день по сравнению с контрольной группой носителя (фиг. 5 и 6). Ни одна мышь во всех экспериментальных группах не погибла в течение периода исследования.

Пример 24. Фармакокинетика в печени соединения 1 и соединения 5.

Соединение 1 (20 мг на кг), соединение 5 (10 мг на кг) и пентамидин (20 мг на кг) были протестированы относительно их РК. Образцы тканей собирали, как описано выше в примере 23. Вкратце, образцы крови (приблизительно 50-60 μ/л) собирали под легкой анестезией изофлураном из ретроорбитального сплетения мышей через 0,5, 1, 3, 8, 48 и 72 часа. Образцы плазмы отделяли центрифугированием при 2000 g в течение 6 минут и хранили при температуре ниже  $-70 \pm 10^\circ\text{C}$  до биоанализа. Сразу после сбора крови животных умерщвляли с использованием удушья избытком  $\text{CO}_2$ , и образцы собирали у группы из пяти мышей в каждый момент времени. Собранные образцы тканей немедленно погружали в ледяной ФСБ и трижды промыли им (в течение 5-10 секунд/промывание, используя ~ 5-10 мл свежего ФСБ в одноразовой чашке Петри для каждого промывания) и сушили на промокательной бумаге. Образцы тканей гомогенизировали, используя ледяной фосфатный буферный раствор (pH 7,4), и гомогенаты хранили при температуре ниже  $-70 \pm 10^\circ\text{C}$  до анализа. Общий объем гомогената был в три раза больше веса ткани, за исключением образцов печени, общий объем гомогената был в десять раз больше веса печени. Процесс биоанализа определяли с помощью универсального метода ЖХ-МС/МС.

Калибровочные образцы получали путем добавления тестируемого соединения в нулевую плазму крови. 10 мкл рабочего калибровочного образца добавляли к 190 мкл нулевой мышинной плазмы или гомогената ткани для получения калибровочных образцов с линейным добавлением. Калибровочные концентрации составляли 5000, 2000, 1000, 200, 100, 20, 10, 2 и 1 нг/мл. Калибровочные образцы обрабатывали вместе с образцами для испытаний. Аликвоты по двадцать пять мкл исследуемых образцов плазмы крови или гомогената ткани обрабатывали 100 мкл ацетонитрила, содержащего внутренний стандарт (500 нг/мл глипизид). Образцы встряхивали в течение 5 минут. Образцы центрифугировали 10 мин со скоростью 4000 об./мин. при  $4^\circ\text{C}$ . После центрифугирования 100 мкл прозрачной надосадочной жидкости переносили в 96-луночные планшеты и анализировали с помощью ЖХ-МС/МС. Хроматографическое разделение было достигнуто с использованием колонки Kintex Polar (C18, 100 X 4,6 мм, 5 мкм) и температуры термостата колонки  $45^\circ\text{C}$ . Для соединения 1 ди HCl подвижной фазой А была вода с 0,1% муравьиной кислотой в ацетонитриле; подвижная фаза В составляла 10 мМ формиата аммония. Однако подвижная фаза для пентамидаина и подвижная фаза А соединения 5 представляла собой воду с 0,1% муравьиной кислотой и подвижную фазу В ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой.

Программа градиента для соединения 1 была следующей: 5% В (1-2,40 мин.), 90% В (2,60-3,00 мин) и начальное значение для В составляло 90%. Скорость удерживания составляла 1,47 за минуту, а внутренний стандарт глипизид составлял 1 за 9 мин. Колонку поддерживали при  $45^\circ\text{C}$ . Для пентамидаина и соединения 5 анализ выполняли с использованием 233 MassSpec от AB Sciex API5000 с интерфейсом Turbo Ion Spray, работающим в режиме положительной ионизации. Количественный анализ проводили с использованием метода множественного отслеживания реакций (MRM) с переходами (m/z) 328 а (m/z) 311 для соединения 5 и (m/z) 548 а (m/z) 366 для эдоксабана (внутренний стандарт). В то время как для пентамидаина (m/z) 341 а (m/z) 324 и (m/z) 548 а (m/z) 366 для верапамила (внутренний стандарт).

Программа градиента для соединения 5 была следующей: 10% В (0-0,2 мин), 95% В (1,5-2 мин), начальное значение для В составляло 10% и прекращалось через 2,6 мин. Скорость потока составляла 0,5 мл/мин. Программа градиента для пентамидаина была следующей: 10% В (0-0,2 мин), 95% В (1,4-2 мин), начальное значение для В составляло 10% и прекращалось через 2,5 мин. Расход составлял 0,5 мл/мин.

Как показано на фиг. 7, соединение 1 (20 мг/кг) и соединение 5 (10 мг/кг) продемонстрировали большее воздействие на печень, чем пентамидин (20 мг/кг) после перорального введения (п/о). После нормализации  $C_{\max}$  для соединения 1 (20 мг/кг, п/о) была почти в 7 раз выше, чем у пентамидаина (20 мг/кг, п/о). Соединение 5 в дозе 10 мг/кг п/о показало те же уровни воздействия, что и соединение 1 в дозе 20 мг/кг п/о. Оба соединения 1 и 5 продемонстрировали более высокий период полураспада, чем пентамидин. Соединение 5 продемонстрировало более высокий период полужизни (приблизительно в 3 раза), чем соединение 1. На фиг. 8 показаны степени воздействия соединения 1 в печени/почках/тонком кишечнике/подвздошной кишке/плазме крови.

В целом, соединение 1 и соединение 5 проявили повышенное воздействие в печени, а также в тонком кишечнике и подвздошной кишке, тогда как их воздействие в плазме крови было низким по сравнению с другими тканями.

Пример 25. Оценка цитотоксичности соединения 1 *in vitro*.

В эксперименте тестировали пентамидин, соединение 1 и стандартный контрольный препарат, цисплатин, в среде полного развития в течение 8 дней. Клетки Hep-3b первоначально обрабатывали тестируемыми соединениями в день 0, а затем клетки пополняли свежими разведенными соединениями в день 3. Соединение 1, пентамидин и цисплатин тестировали в 9 точках концентрации: 100 мкМ, 33,33 мкМ, 11,11 мкМ, 3,70 мкМ, 1,23 мкМ, 0,41 мкМ, 0,14 мкМ, 0,05 мкМ и 0,02 мкМ (конечная концентрация ДМСО=0,5%). Значения исходных данных из анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo™, выраженные в относительных единицах люминесценции, были нормализованы к носителю для каждого отдельного планшета, и любое снижение люминесценции указывало на снижение жизнеспособности (%). Данные анализировали в GraphPad PRISM с использованием нелинейного сигмоидального графика с пе-

ременным наклоном (асимметричная четырехточечная линейная регрессия) и получали значение  $IC_{50}$  для каждого соединения. Кривые зависимость доза-ответ показаны на фиг. 7. Значения  $IC_{50}$  были получены на основе нормализованных кривых зависимости доза-ответ. Значения  $IC_{50}$  пентамидина и соединения 1 составляли 0,8 и 0,6 мкМ в Hsp-3b lux соответственно. Значение  $IC_{50}$  для цисплатина (5,1 мкМ) согласовалось с более ранними данными.

Пример. 26 Ортоотопическое исследование толстой кишки *in vivo*.

Этот пример показывает переносимость и влияние соединения 1 на рост опухоли в исследовании ортоотопического рака толстой кишки.

#### Методы

Примерно  $2,0 \times$  люциферазы, стабильно экспрессирующей опухолевые клетки рака толстой кишки (COLO 205-Luc), суспендированные в 30 мкл DPBS, вводили инъекцией в стенку слепой кишки бестимусных мышей BALB/c.

Животных отбирали для группирования на 20-й день после имплантации опухоли, когда интенсивность их биолюминесценции увеличивалась для 3 последовательных измерений, что указывает на то, что опухоли находятся в фазе роста (среднее измерение биолюминесценции достигло  $2,13 \times 10^7$  фотонов/с). Животных распределяли в группы с помощью программного обеспечения рандомизации на основе Excel, выполняющего стратифицированную рандомизацию на основе интенсивности их биолюминесценции. Лечение было начато в соответствии с заранее установленной схемой лечения, как показано в табл. экспериментального плана.

Мышам вводили соединение 1 в дозе 10 мг/кг ежедневно, 20 мг/кг ежедневно, 10 мг/кг два раза в день, 20 мг/кг два раза в день или 40 мг/кг ежедневно.

Таблица 9

#### Описание получения тестируемого продукта

Соединения	Упаковка	Получение	Концентрация (мг/мл)	Хранение
Носитель	--	ddH <sub>2</sub> O	--	4 °C
Соединение 1	1,52 г/сосуд	Взвешивали 68,96 мг порошка соединения 1 в один флакон для реактивов, добавляли 14,00 мл ddH <sub>2</sub> O, встряхивали и получали прозрачный раствор.	4,0 мг/мл	4 °C
Соединение 1	1,52 г/сосуд	Взвешивали 103,43 мг порошка соединения 1 в один флакон для реактивов, добавляли 42,00 мл ddH <sub>2</sub> O, встряхивали и получали прозрачный раствор.	2,0 мг/мл	4 °C
Соединение 1	1,52 г/сосуд	Взвешивали 51,72 мг порошка соединения 1 в один флакон для реактивов, добавляли 42,00 мл ddH <sub>2</sub> O, встряхивали и получали прозрачный раствор.	1,0 мг/мл	4 °C

Основным критерием эффективности была биолюминесценция (значения интенсивности и изменение по сравнению с исходным уровнем). Хирургически инокулированных мышей взвешивали и внутрибрюшинно вводили люциферин в дозе 150 мг/кг. Через десять минут после инъекции люциферина животных предварительно обезболивали газовой смесью кислорода и изофлурана. Когда животные находились в состоянии полной анестезии, мышей перемещали в камеру для визуализации для измерений биолюминесценции с помощью системы визуализации IVIS (Lumina II). Биолюминесценцию всего тела животного, включая первичные и метастатические опухоли, измеряли и записывали один раз в неделю.

Подавление роста опухоли (TGI) рассчитывали для каждой группы по формуле:

$$TGI (\%) = [1 - (Ti - T0) / (Vi - V0)] \times 100;$$

$T_i$  - среднее значение биолюминесценции опухоли в группе лечения в данный день,  $T_0$  - среднее значение биолюминесценции опухоли в группе лечения в день 0,  $V_i$  - среднее значение биолюминесценции опухоли контрольной группы носителя в тот же день с  $T_i$ , и  $V_0$  - среднее значение биолюминесценции опухоли в группе носителя в день 0.

Вес опухоли измеряли по окончании исследования. Значение  $T/C_{\text{weight}}$  (в процентах) рассчитывается с помощью формулы:

$$T/C_{\text{weight}}\% = T_{\text{weight}}/C_{\text{weight}} \times 100\%,$$

где  $T_{\text{weight}}$  и  $C_{\text{weight}}$  представляли собой средние значения массы опухоли групп, получавших лечение, и контрольных групп носителя соответственно.

Для сравнения трех или более групп выполняли однофакторный дисперсионный анализ. Если получена несущественная F-статистика (отношение дисперсии лечения к дисперсии ошибки), сравнения между группами проводили с помощью критерия Даннета (2-стороннего). Все данные были проанализированы с помощью SPSS 17.0.  $p < 0,05$  считается статистически значимым.

#### Результаты

Вес тела животных регулярно контролировался как косвенный показатель токсичности. Очевидно, что ни одна из групп не потеряла вес в результате введения соединения 1 (табл. 10 и Фиг. 10). На фиг. 10 показано относительное изменение веса тела (%) с первого дня введения дозы. Экспериментальные точки представляют собой процентное среднее изменение массы тела по группе. Планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего (SEM). Смертей и заболеваемости не было. Таким образом, нет очевидной токсичности, связанной с введением соединения 1 голым мышам BALB/c, несущих опухоль.

Таблица 10

## Изменение массы тела мышей в разных группах

Дни после начала лечения	Группы					
	Соед инен	Соединение 1, 10	Соединение 1, 20	Соединение 1, 40	Соединение 1, 100	
	Нос итель мг/кг , раз в день	20 мг/кг ежедневно	40 мг/кг ежедневно	100 мг/кг, два раза в день	200 мг/кг, два раза в день	
0	21,2 ± 0,5 <sup>a</sup>	20,9 ± 0,5	20,8 ± 0,4	20,7 ± 0,5	21,0 ± 0,4	20,9 ± 0,5
3	21,4 ± 0,5	21,4 ± 0,5	20,8 ± 0,3	20,7 ± 0,5	21,2 ± 0,4	20,9 ± 0,5
7	21,2 ± 0,6	21,6 ± 0,5	20,8 ± 0,4	20,2 ± 0,4	21,2 ± 0,4	21,1 ± 0,5
10	21,5 ± 0,5	21,5 ± 0,4	21,0 ± 0,3	20,3 ± 0,5	21,2 ± 0,3	21,1 ± 0,5
14	21,7 ± 0,5	21,7 ± 0,4	21,2 ± 0,3	20,5 ± 0,5	21,8 ± 0,4	21,5 ± 0,6
17	21,7 ± 0,5	21,7 ± 0,4	21,3 ± 0,4	20,5 ± 0,5	22,1 ± 0,4	21,6 ± 0,6
22	21,4 ± 0,4	21,7 ± 0,5	21,1 ± 0,4	20,4 ± 0,5	21,2 ± 0,4	20,9 ± 0,5
24	21,8 ± 0,4	22,2 ± 0,6	21,6 ± 0,3	21,0 ± 0,5	21,5 ± 0,3	21,3 ± 0,5
28	22,5 ± 0,5	22,6 ± 0,5	21,5 ± 0,4	21,3 ± 0,5	22,0 ± 0,3	21,7 ± 0,5

Среднее значение ± стандартная ошибка среднего

Биolumинесценцию использовали для измерения размера опухоли в ответ на лечение соединением 1.

Таблица 11

Относительная биолюминесценция (%) с течением времени				Дни после начала лечения				
				0	7	14	22	28
Носитель				100 ± 312	± 1162	± 1433	± 2724	±
				0 <sup>a</sup>	63	525	451	735
СОЕДИНЕНИЕ 1, 10 мг/кг, ежедневно	1,	10	мг/кг,	100 ± 351	± 1425	± 2819	± 3171	±
				0	88	930	1388	1602
СОЕДИНЕНИЕ 1, 20 мг/кг, ежедневно	1,	20	мг/кг,	100 ± 171	± 817	± 923 ± 354	1613	±
				0	46	269	1022	
СОЕДИНЕНИЕ 1, 40 мг/кг, ежедневно	1,	40	мг/кг,	100 ± 210	± 357	± 525 ± 145	512 ± 206	
				0	57	109		
СОЕДИНЕНИЕ 1, 10 мг/кг, два раза в день	1,	10	мг/кг, два раза в день	100 ± 447	± 1033	± 2993	± 2715	±
				0	103	385	1325	950
СОЕДИНЕНИЕ 1, 20 мг/кг, два раза в день	1,	20	мг/кг, два раза в день	100 ± 299	± 1108	± 2340	± 1877	±
				0	91	433	1230	1076

Среднее значение ± стандартная ошибка среднего

Фиг. 11 представляет собой график относительной биолюминесценции во времени как показатель роста опухоли.

Это исследование показывает, что соединение 1 не обладает значительной токсичностью и хорошо переносится. Кроме того, наблюдалась нестатистически значимая тенденция, указывающая на то, что соединение 1, вводимое в дозе 20 мг/кг или 40 мг/кг ежедневно, может быть эффективным для уменьшения роста опухоли. Дальнейшее исследование, оценивающее режим суточного дозирования 40 мг/кг, может быть проведено в соответствии с примером 27.

Пример 27. Последующее ортотопическое исследование толстой кишки *in vivo* при суточной дозе 40 мг/кг.

#### Методы

Приблизительно  $2,0 \times 10^6$  клеток Colo205-luc2, суспендированных в 30 мкл DPBS, вводят в стенку слепой кишки бестимусных мышей BALB/c.

Животных отбирают для группирования на 20-й день после имплантации опухоли, когда интенсивность их биолюминесценции увеличивалась для 3 последовательных измерений, что указывает на то, что опухоли находятся в фазе роста (среднее измерение биолюминесценции достигло  $2,13 \times 10^7$  фотонов/с). Животных распределяют в группы с помощью программного обеспечения рандомизации на основе Excel, выполняющего стратифицированную рандомизацию на основе интенсивности их биолюминесценции. Мышам вводят соединение 1 в дозе 40 мг/кг ежедневно.

Основным критерием эффективности является биолюминесценция (значения интенсивности и изменение по сравнению с исходным уровнем). Хирургически инокулированных мышей взвешивают и внутрибрюшинно вводят люциферин в дозе 150 мг/кг. Через десять минут после инъекции люциферина животных предварительно обезболивают газовой смесью кислорода и изофлурана. Когда животные оказываются в состоянии полной анестезии, мышей перемещают в камеру для визуализации для измерений биолюминесценции с помощью системы визуализации IVIS (Lumina II). Биолюминесценцию всего тела животного, включая первичные и метастатические опухоли, измеряют и записывают один раз в неделю.

Подавление роста опухоли (TGI) рассчитывается для каждой группы по формуле:

$$TGI(\%) = [1 - (Ti - T0) / (Vi - V0)] \times 100;$$

Ti - среднее значение биолюминесценции опухоли в группе лечения в данный день, T0 - среднее значение биолюминесценции опухоли в группе лечения в день 0, Vi - среднее значение биолюминесценции опухоли контрольной группы носителя в тот же день с Ti, и V0 - среднее значение биолюминесценции опухоли в группе носителя в день 0.

Вес опухоли измеряют по окончании исследования. Значение  $T/C_{weight}$  (в процентах) рассчитывается с помощью формулы:

$$T/C_{weight} \% = T_{weight} / C_{weight} \times 100\%,$$

где  $T_{weight}$  и  $C_{weight}$  представляют собой средние значения массы опухоли групп, получавших лечение, и контрольных групп носителя соответственно.

Для сравнения трех или более групп выполняется однофакторный дисперсионный анализ. Если получена несущественная F-статистика (отношение дисперсии лечения к дисперсии ошибки), сравнения между группами проводят с помощью критерия Даннета (2-стороннего). Все данные анализируются с

помощью SPSS 17.0.

Пример 28. Ортогепическое исследование печени *in vivo*.

Бестимусным мышам Balb с вводят инъекции  $4 \times 10^6$  люциферазы, стабильно экспрессирующей опухолевые клетки рака почки (ACHN-Luc), в 40 мкл фосфатно-солевом буфере Дюльбекко.

Измеряют билюминесценцию всего тела животного, включая первичные и метастатические опухоли, и записываются изображения.

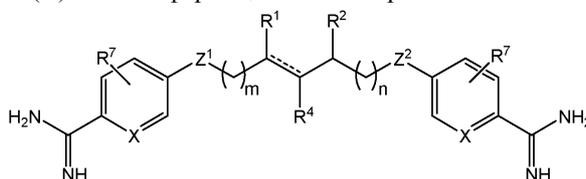
Перед началом лечения всех животных взвешивают и распределяют на две группы с помощью программного обеспечения для рандомизации на основе Excel, выполняющего стратифицированную рандомизацию на основе веса их тела. Это гарантирует, что все группы сопоставимы на исходном уровне. Исследуемые животные получали соединение в дозе 40 мг/кг один раз в день в течение 21 дня.

Группа	n	Лечение	Доза мг/кг	Объем дозирования	Путь дозирования	Схема лечения
1	8	Носитель	--	10 мкл/г	П/О	Ежедневно x21 день
2	8	Соединение 1	40 мг/кг	10 мкл/г	П/О	Ежедневно x21 день

Билюминесценцию и массу тела животного измеряют с течением времени.

### Пронумерованные варианты осуществления

1. Соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемая соль:



формула (II),

где

— представляет собой одинарную или двойную связь;

m или n независимо представляет собой целое число, составляющее 0, 1, 2 или 3;

Z<sup>1</sup> или Z<sup>2</sup> независимо представляет собой O или CR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>; и

только один из X представляет собой N, а второй X представляет собой CR<sub>7</sub>;

где

R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> независимо представляет собой водород, или R<sup>1</sup>, взятый вместе с R<sup>2</sup>, образует 5-, 6- или 7-членный циклоалкил;

R<sup>4</sup> представляет собой водород;

R<sup>5</sup> и R<sup>6</sup> представляют собой водород; и

R<sup>7</sup> представляет собой водород.

2. Соединение, выбранное из группы, состоящей из

5-(5-(4-карбамимидоилфенокси)пентилокси)пиколинимидамида;

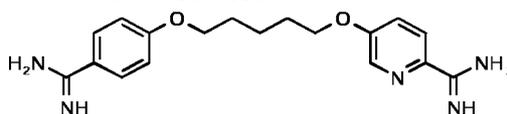
5-(4-(4-карбамимидоилфенокси)бутоксипиколинимидамида;

5-((4-(4-карбамимидоилфенокси)бут-2-ен-1-ил)окси)пиколинимидамида;

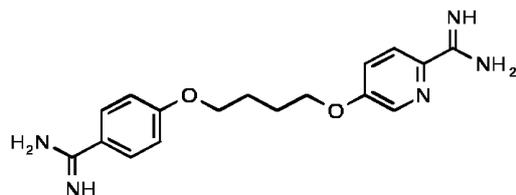
5-(3-(4-карбамимидоилфенокси)пропокси)пиколинимидамида; и

5-{2-[(1R,3S)-3-[2-(4-карбамимидоилфенил)этил]циклогексил]этил} пиридин-2-карбоксимидамида.

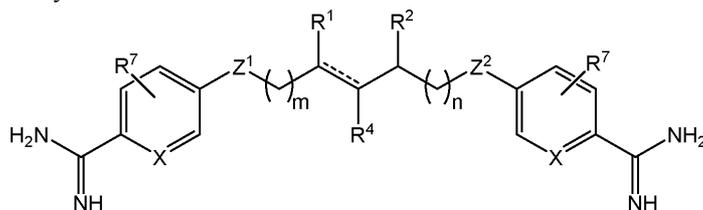
3. Соединение, имеющее следующую структуру:



4. Соединение, имеющее следующую структуру:



5. Способ лечения рака, при этом способ включает введение эффективного количества соединения формулы (II) или его фармацевтически приемлемая соли субъекту, страдающему от рака, где указанная формула (II) является следующей:



формула (II),

где

==== представляет собой одинарную или двойную связь;

m или n независимо представляет собой целое число, составляющее 0, 1, 2 или 3;

Z<sup>1</sup> или Z<sup>2</sup> независимо представляет собой O или CR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>; и

только один из X представляет собой N, а второй X представляет собой CR<sub>7</sub>;

где

R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> независимо представляют собой водород, или

R<sup>1</sup>, взятый вместе с R<sup>2</sup>, образует 5-, 6- или 7-членный циклоалкил;

R<sup>4</sup> представляет собой водород;

R<sup>5</sup> и R<sup>6</sup> представляют собой водород; и

R<sup>7</sup> представляет собой водород.

6. Способ по варианту осуществления 5, где m равно 1, и n равно 1.

7. Способ по варианту осуществления 5, где m равно 1, и n равно 0.

8. Способ по варианту осуществления 5, где m равно 0, и n равно 1.

9. Способ по варианту осуществления 5, где m равно 1, и n равно 2.

10. Способ по варианту осуществления 5, где m равно 2, и n равно 1.

11. Способ по варианту осуществления 5, где m равно 2, и n равно 2.

12. Способ по варианту осуществления 5, где m равно 0, и n равно 0.

13. Способ по варианту осуществления 5, где Z<sup>1</sup> или Z<sup>2</sup> независимо представляет собой O, необязательно замещенный.

14. Способ по варианту осуществления 5, где Z<sup>1</sup> или Z<sup>2</sup> независимо представляет собой CR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>.

15. Способ по варианту осуществления 5, где Z<sup>1</sup> или Z<sup>2</sup> независимо представляет собой CR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>, где R<sup>5</sup> и R<sup>6</sup> представляют собой водород.

16. Способ по варианту осуществления 5, где Z<sup>1</sup> или Z<sup>2</sup> независимо представляет собой O.

17. Способ по варианту осуществления 5, где R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> независимо представляют собой водород.

18. Способ по варианту осуществления 5, где R<sup>1</sup>, взятый вместе с R<sup>2</sup>, образует 5-, 6- или 7-членный циклоалкил.

19. Способ по варианту осуществления 5, где R<sup>1</sup>, взятый вместе с R<sup>2</sup>, образует 6-членный циклоалкил.

20. Способ по варианту осуществления 5, где R<sup>1</sup>, взятый вместе с R<sup>2</sup>, образует 7-членный циклоалкил.

21. Способ по варианту осуществления 5, где указанный рак выбран из группы, состоящей из рака печени, холангиокарциномы, остеосаркомы, меланому, рака молочной железы, почечного рака, рака предстательной железы, рака желудка, колоректального рака, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака нервной системы, рака легкого, рака матки, лейкемии и лимфомы.

22. Способ по варианту осуществления 21, где указанный рак представляет собой рак печени.

23. Способ по варианту осуществления 21, где указанный рак представляет собой холангиокарциному.

24. Способ по варианту осуществления 21, где указанный рак представляет собой рак предстательной железы.

25. Способ по варианту осуществления 21, где указанный рак представляет собой рак поджелудочной железы.

26. Способ по варианту осуществления 21, где указанный рак представляет собой рак легкого.

27. Способ по варианту осуществления 21, где указанный рак представляет собой мелкоклеточный рак легкого.

28. Способ по варианту осуществления 21, где указанный рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

29. Способ по варианту осуществления 21, где указанный рак представляет собой рак молочной железы.

30. Способ по варианту осуществления 21, где указанный рак представляет собой колоректальный рак.

31. Способ по варианту осуществления 21, где указанный рак представляет собой почечный рак.

32. Способ по варианту осуществления 5, где указанное соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту перорально, внутривенно или подкожно в дозе около 0,5 мг на кг, 0,6 мг на кг, около 0,7 мг на кг, около 0,8 мг на кг, около 0,9 мг на кг, около 1 мг на кг, около 2 мг на кг, около 3 мг на кг, около 4 мг на кг, около 5 мг на кг, около 6 мг на кг, около 7 мг на кг, около 8 мг на кг, около 9 мг на кг, около 10 мг на кг, около 15 мг на кг, около 20 мг на кг, около 30 мг на кг, около 40 мг на кг, около 50 мг на кг, около 60 мг на кг, около 70 мг на кг, около 80 мг на кг, около 90 мг на кг, около 100 мг на кг, около 110 мг на кг, около 120 мг на кг, около 130 мг на кг, около 140 мг на кг, около 150 мг на кг, около 160 мг на кг, около 170 мг на кг, около 180 мг на кг, около 190 мг на кг, около 200 мг на кг, около 210 мг на кг, около 220 мг на кг, около 230 мг на кг, около 240 мг на кг, около 250 мг на кг, около 260 мг на кг, около 270 мг на кг, около 280 мг на кг, около 290 мг на кг, около 300 мг на кг, около 350 мг на кг, около 400 мг на кг, около 450 мг на кг, около 500 мг на кг или около 600 мг на кг.

33. Способ по варианту осуществления 5, где указанный субъект представляет собой пациента-человека.

34. Способ по варианту осуществления 5, где указанное соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль вводят пациенту-человеку перорально.

35. Способ по варианту осуществления 5, где указанному субъекту вводят от 1 мг на кг до 200 мг на кг ежедневно.

36. Способ по варианту осуществления 5, где указанному субъекту вводят от 1 мг на кг до 100 мг на кг ежедневно.

37. Способ по варианту осуществления 5, где указанному субъекту вводят от 1 мг на кг до 50 мг на кг ежедневно.

38. Способ по варианту осуществления 5, где указанному субъекту вводят от 0,5 мг на кг до 50 мг на кг ежедневно.

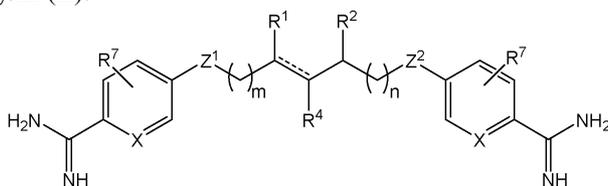
39. Способ по варианту осуществления 5, где указанному субъекту вводят от 2 мг на кг ежедневно.

Многие модификации и вариации настоящего изобретения могут быть выполнены без отклонения от его сущности и объема, как будет очевидно специалистам в данной области техники. Описанные в данном документе конкретные варианты осуществления предлагаются только в качестве примера, и изобретение должно быть ограничено только условиями прилагаемой формулы изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, на которые эта формула изобретения имеет право. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Все ссылки, патентные и непатентные, процитированные в данном документе, включены в данный документ в качестве ссылки во всей своей полноте и для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были специально и отдельно указаны для включения в качестве ссылки во всей ее полноте для всех целей.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

### 1. Соединение формулы (II):



Формула (II)

или его фармацевтически приемлемая соль, где

==== представляет собой одинарную или двойную связь;

m или n независимо представляет собой целое число, составляющее 0, 1, 2 или 3;

Z<sup>1</sup> или Z<sup>2</sup> независимо представляет собой O или CR<sup>3</sup>R<sup>6</sup>;

только один из X представляет собой N, а второй X представляет собой CR<sub>7</sub>;

каждый из R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> независимо представляет собой водород,

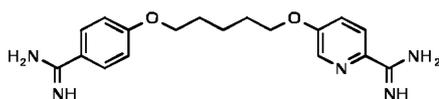
или R<sup>1</sup>, взятый вместе с R<sup>2</sup>, образует 5-, 6- или 7-членный циклоалкил;

$R^4$  представляет собой водород;

$R^5$  и  $R^6$  представляют собой водород; и

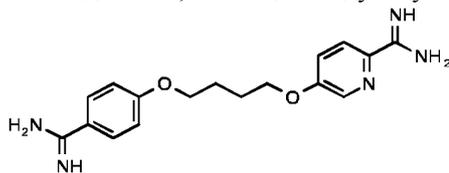
$R^7$  представляет собой водород.

2. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $m$  равно 1 и  $n$  равно 1.
3. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $m$  равно 1 и  $n$  равно 0.
4. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $m$  равно 0 и  $n$  равно 1.
5. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $m$  равно 1 и  $n$  равно 2.
6. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $m$  равно 2 и  $n$  равно 1.
7. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $m$  равно 2 и  $n$  равно 2.
8. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $m$  равно 0 и  $n$  равно 0.
9. Соединение по любому из пп.1-8 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $Z^1$  или  $Z^2$  независимо представляет собой O.
10. Соединение по любому из пп.1-8 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $Z^1$  или  $Z^2$  независимо представляет собой  $CR^5R^6$ .
11. Соединение по любому из пп.1-10 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $R^1$ , взятый вместе с  $R^2$ , образует 5-, 6- или 7-членный циклоалкил.
12. Соединение по п.11 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $R^1$ , взятый вместе с  $R^2$ , образует 6-членный циклоалкил.
13. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, причем соединение выбрано из группы, состоящей из
  - 5-(5-(4-карбамимидоилфенокси)пентилокси)пиколинимидамида;
  - 5-(4-(4-карбамимидоилфенокси)бутоксипиколинимидамида;
  - 5-((4-(4-карбамимидоилфенокси)бут-2-ен-1-ил)окси)пиколинимидамида;
  - 5-(3-(4-карбамимидоилфенокси)пропокси)пиколинимидамида;
  - 5-{2-[(1R,3S)-3-[2-(4-карбамимидоилфенил)этил]циклогексил]этил} пиридин-2-карбоксимидамида.
14. Соединение, имеющее следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль.

15. Соединение, имеющее следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1-15 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель.
17. Способ лечения рака, включающий введение эффективного количества соединения по любому из пп.1-15, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п.16 субъекту, страдающему от рака, где указанный рак выбран из группы, состоящей из рака печени, холангиокарциномы, остеосаркомы, меланомы, рака молочной железы, почечного рака, рака предстательной железы, рака желудка, колоректального рака, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака нервной системы, рака легкого, рака матки, лейкемии и лимфомы.
18. Способ по п.17, в котором указанный рак представляет собой рак печени.
19. Способ по п.17, в котором указанный рак представляет собой холангиокарциному.
20. Способ по п.17, в котором указанный рак представляет собой рак предстательной железы.
21. Способ по п.17, в котором указанный рак представляет собой рак поджелудочной железы.
22. Способ по п.17, в котором указанный рак представляет собой рак легкого.
23. Способ по п.17, в котором указанный рак представляет собой мелкоклеточный рак легкого.
24. Способ по п.17, в котором указанный рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого.
25. Способ по п.17, в котором указанный рак представляет собой рак молочной железы.
26. Способ по п.17, в котором указанный рак представляет собой колоректальный рак.

27. Способ по п.17, в котором указанный рак представляет собой почечный рак.

28. Способ по п.17, в котором указанный рак представляет собой солидную опухоль.

29. Способ по п.17, в котором указанное соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту перорально, внутривенно или подкожно в дозе около 0,5 мг на кг, 0,6 мг на кг, около 0,7 мг на кг, около 0,8 мг на кг, около 0,9 мг на кг, около 1 мг на кг, около 2 мг на кг, около 3 мг на кг, около 4 мг на кг, около 5 мг на кг, около 6 мг на кг, около 7 мг на кг, около 8 мг на кг, около 9 мг на кг, около 10 мг на кг, около 15 мг на кг, около 20 мг на кг, около 30 мг на кг, около 40 мг на кг, около 50 мг на кг, около 60 мг на кг, около 70 мг на кг, около 80 мг на кг, около 90 мг на кг, около 100 мг на кг, около 110 мг на кг, около 120 мг на кг, около 130 мг на кг, около 140 мг на кг, около 150 мг на кг, около 160 мг на кг, около 170 мг на кг, около 180 мг на кг, около 190 мг на кг, около 200 мг на кг, около 210 мг на кг, около 220 мг на кг, около 230 мг на кг, около 240 мг на кг, около 250 мг на кг, около 260 мг на кг, около 270 мг на кг, около 280 мг на кг, около 290 мг на кг, около 300 мг на кг, около 350 мг на кг, около 400 мг на кг, около 450 мг на кг, около 500 мг на кг или около 600 мг на кг.

30. Способ по п.29, в котором указанный субъект представляет собой пациента-человека.

31. Способ по п.30, в котором указанное соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль вводят пациенту-человеку перорально.

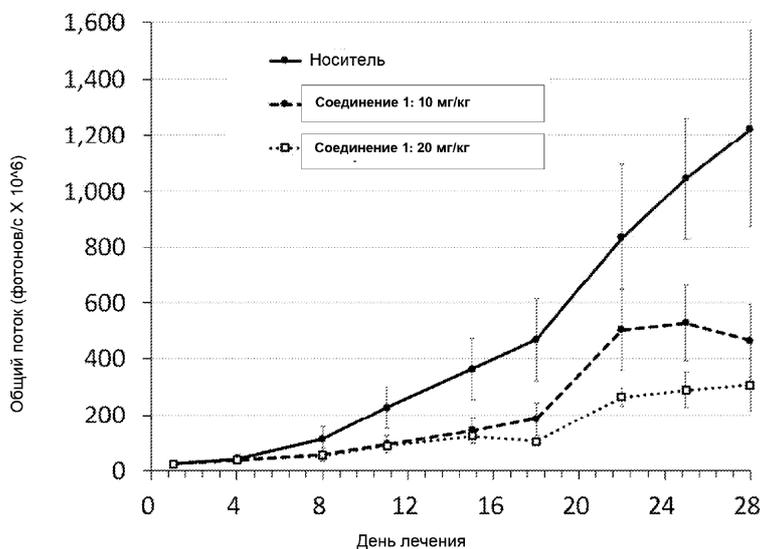
32. Способ по п.17, в котором указанному субъекту вводят от 1 мг на кг до 200 мг на кг ежедневно.

33. Способ по п.17, в котором указанному субъекту вводят от 1 мг на кг до 100 мг на кг ежедневно.

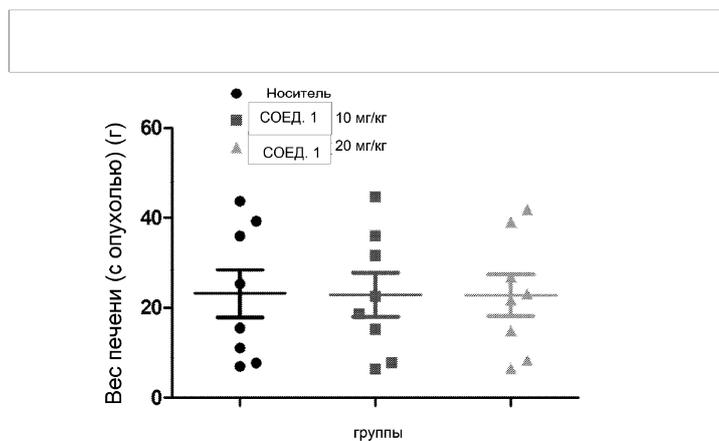
34. Способ по п.17, в котором указанному субъекту вводят от 1 мг на кг до 50 мг на кг ежедневно.

35. Способ по п.17, в котором указанному субъекту вводят от 0,5 мг на кг до 50 мг на кг ежедневно.

36. Способ по п.17, в котором указанному субъекту вводят 2 мг на кг ежедневно.



Фиг. 1

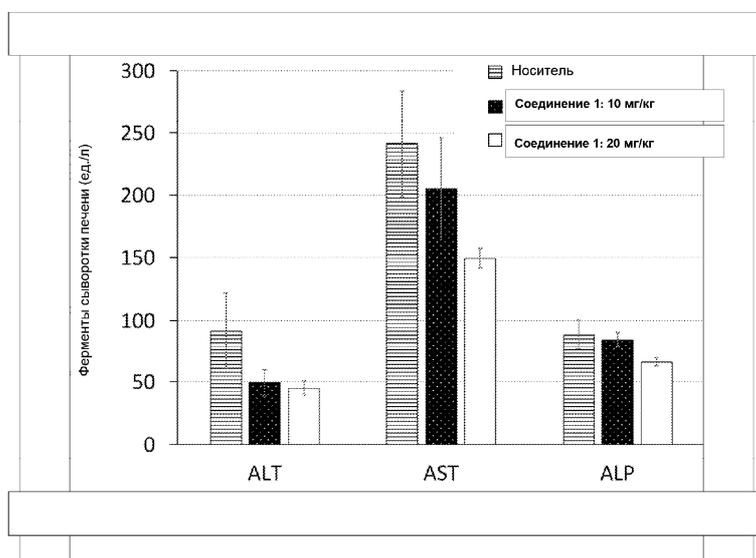


Фиг. 2

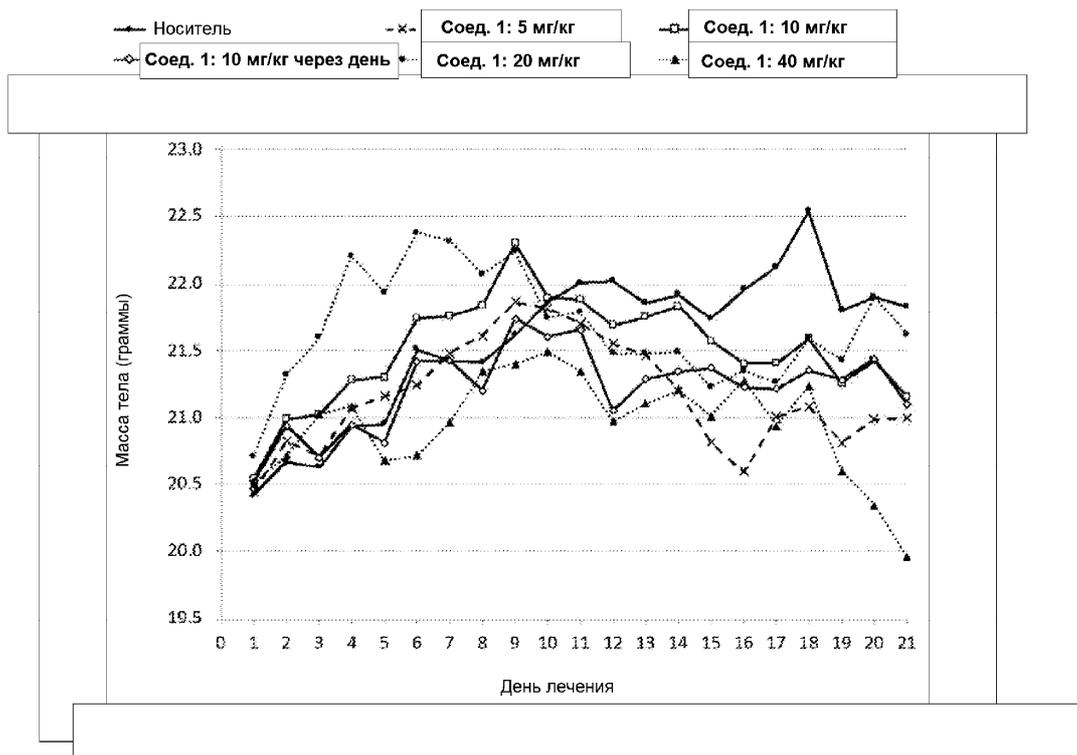
Нер3В2.1-7-Luc



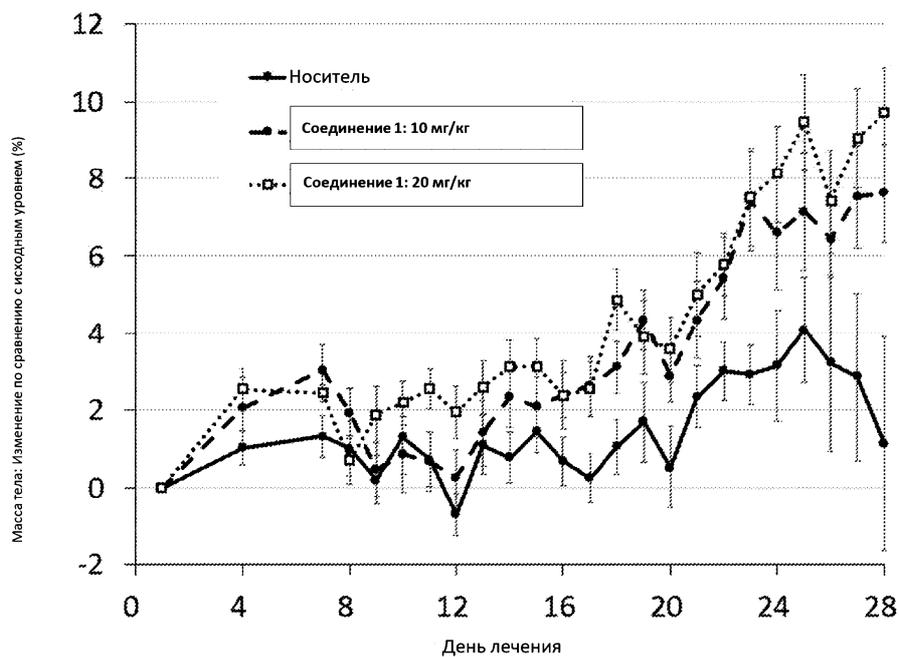
Фиг. 3



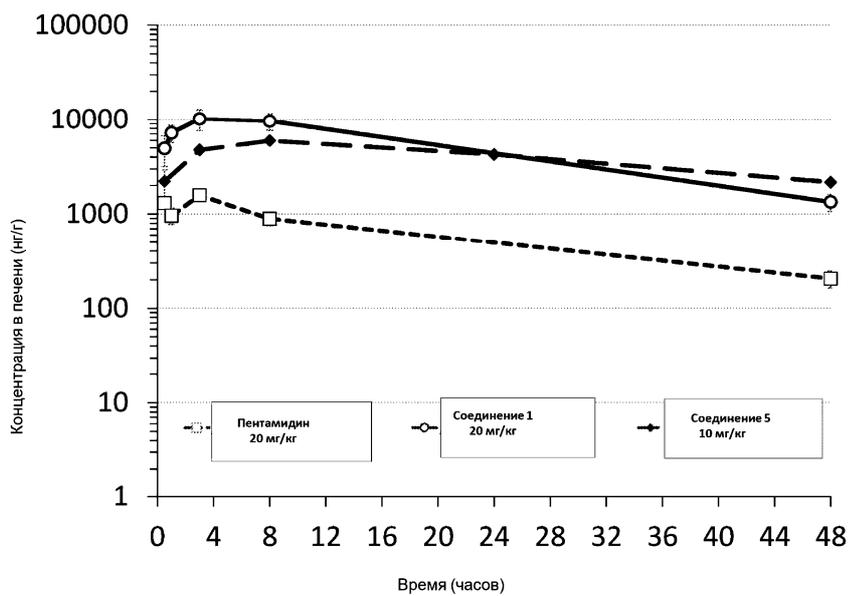
Фиг. 4



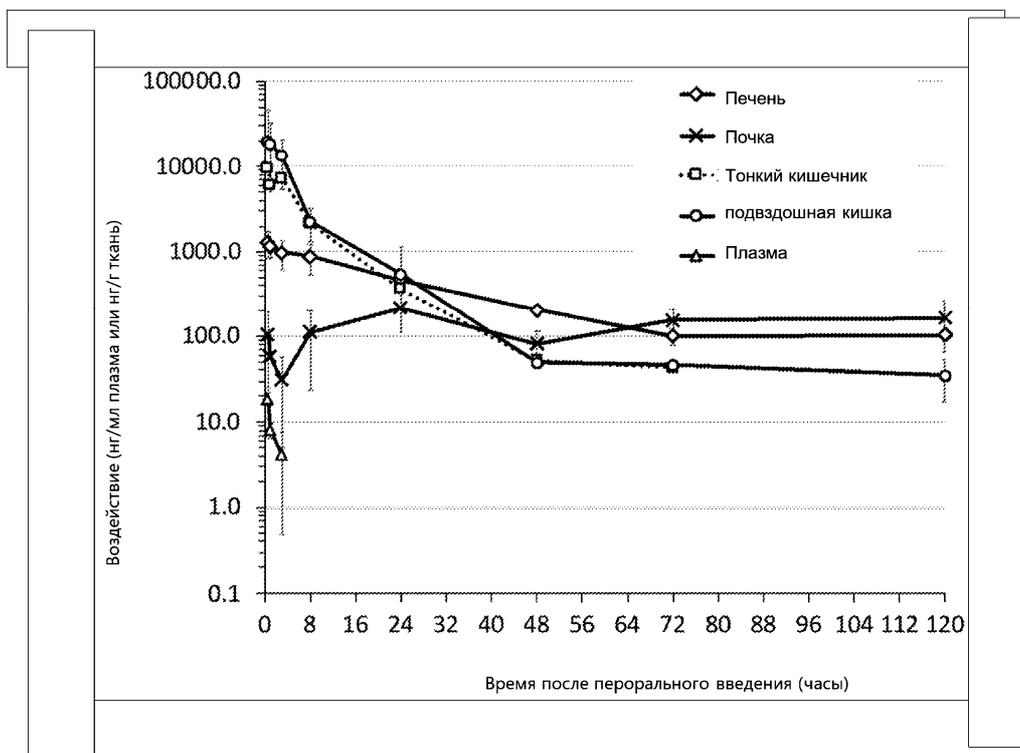
Фиг. 5



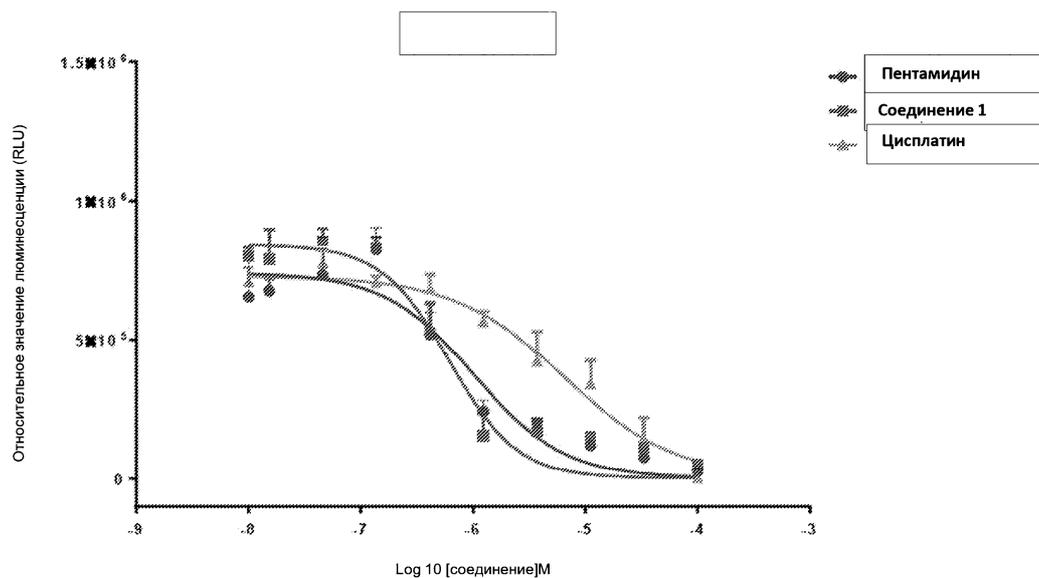
Фиг. 6



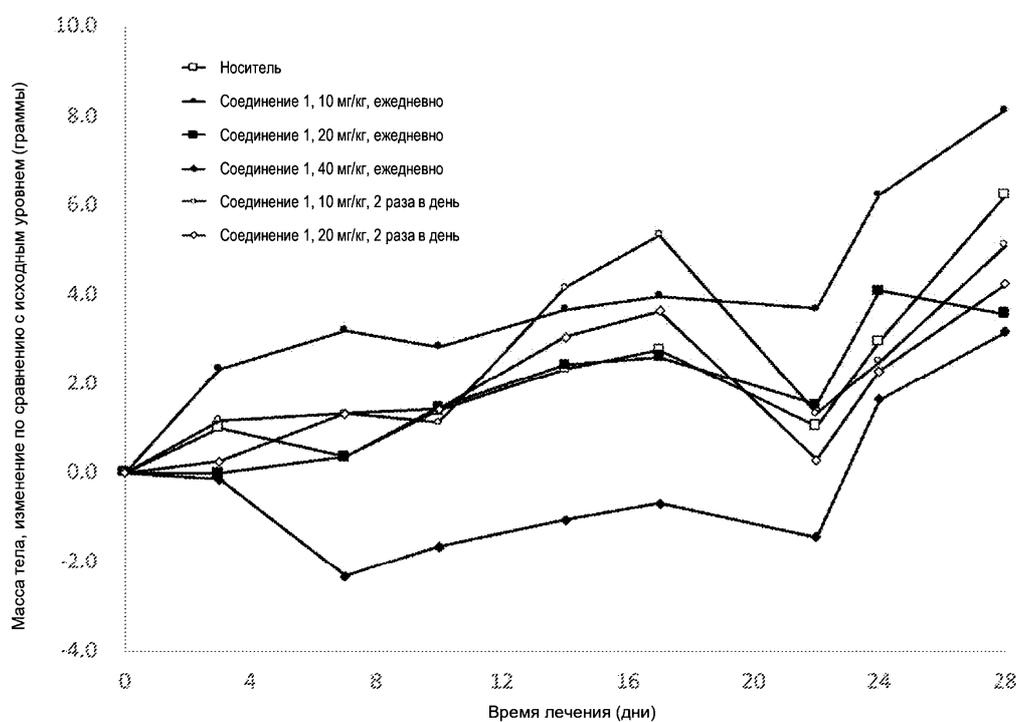
Фиг. 7



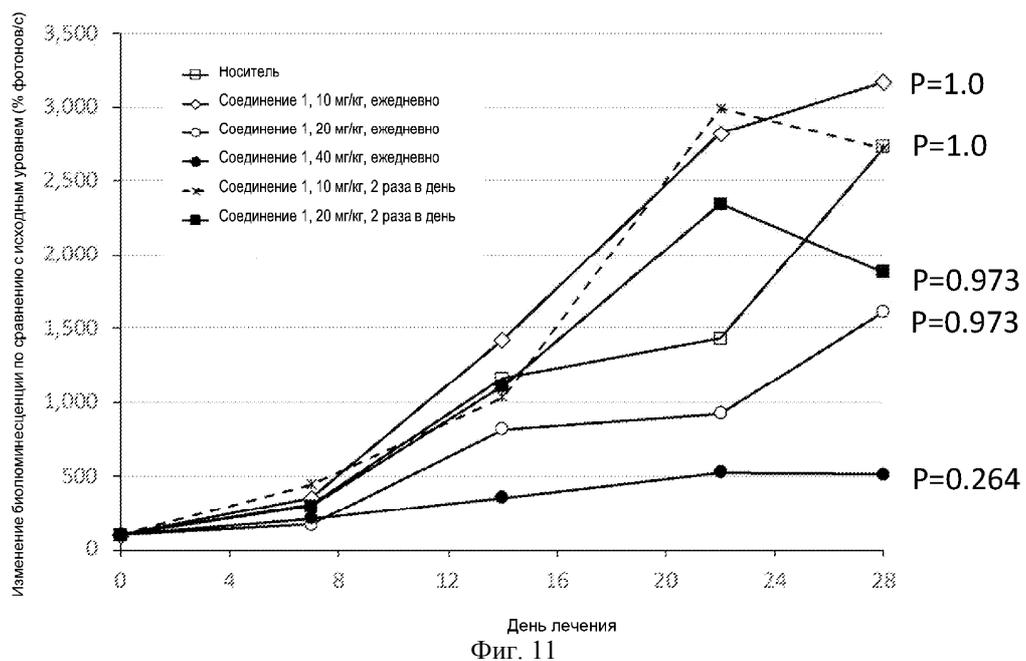
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2