

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046318**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2024.02.28

(21) Номер заявки

202190752

(22) Дата подачи заявки

2019.09.25

(51) Int. Cl. *C07D 405/14* (2006.01)
C07D 471/08 (2006.01)
C07D 487/08 (2006.01)
C07D 451/06 (2006.01)
C07D 491/107 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

**(54) ПОЛУЧЕНИЕ ИНГИБИТОРА СЕМИКАРБАЗИД-ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ
АМИНОКСИДАЗЫ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 201811119234.2

(32) 2018.09.25

(33) CN

(43) 2021.08.24

(86) PCT/CN2019/107972

(87) WO 2020/063696 2020.04.02

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ШАНХАЙ ИННОВАБИО
ФАРМАСЬЮТИКАЛС КО., ЛТД.
(CN)**

(72) Изобретатель:

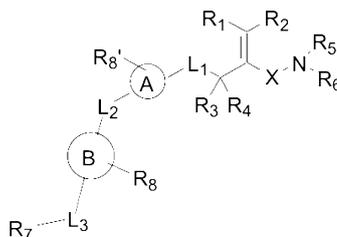
**Лю Шэнъян, Ден Цзяньвэнь, Фэн
Чжиюн, Цян Лэй, Цяо Чжи, Шан Кэ,
Се Сяопин, Сюй Сюэли, Сюй Юань,
Чжао Хайся (CN)**

(74) Представитель:

Махлина М.Г. (RU)

(56) WO-A1-2018151985
WO-A1-2018151985
WO-A1-2018028517
WO-A1-2018028517
CN-A-109251166
CN-A-107266332
CN-A-101917845

(57) В изобретении предложен препарат ингибитора семикарбазид-чувствительной аминоксидазы и его применение. В частности, изобретение представляет собой соединение, показанное в формуле I, или его стереоизомер, или рацемат, или фармацевтически приемлемую соль. Также раскрыто, что указанное выше соединение может ингибировать семикарбазид-чувствительную аминоксидазу.



I

B1**046318****046318****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области фармацевтической технологии, более конкретно к классу ингибиторов семикарбазид-чувствительной аминоксидазы.

Уровень техники

Семикарбазид-чувствительная аминоксидаза (SSAO) представляет собой тип аминоксидазы, содержащей дофамин-хиноновые группы, которая является членом семейства семикарбазид-чувствительных аминоксидаз и она также называется сосудистый адгезивный белок-1, VAP-1 (белок сосудистой адгезии 1). Он в основном кодируется геном AOC3 у животных. Гладкомышечные клетки, адипоциты и эндотелиальные клетки млекопитающих содержат большое количество SSAO, и она также экспрессируется в различных органах, таких как сосуды, хрящи и почки. SSAO у млекопитающих в основном состоит из двух изоформ: мембраносвязанной изоформы и растворимой изоформы. Активность ферментов сильно различается у разных видов и разных тканей одного и того же вида. SSAO может катализировать и метаболизировать эндогенные или пищевые амины в альдегиды и производить перекись водорода и аммиак. Природные метаболические субстраты в организме - это в основном алифатические амины и ароматические амины, при этом метиламин (МА) и аминокетон признаны двумя основными физиологическими субстратами SSAO, которые катализируются в формальдегид и пировиноградный альдегид соответственно. В эндотелиальных клетках SSAO существует в форме сосудистого адгезивного белка-1, который опосредует адгезию лейкоцитов к эндотелиальным клеткам и их экссудацию.

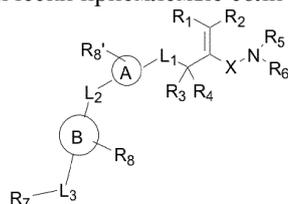
Большое количество исследований подтвердило, что SSAO и ее метаболиты тесно связаны с атеросклерозом, диабетом и их осложнениями, ожирением, инсультом, хроническим заболеванием почек, ретинопатией, хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), аутоиммунными заболеваниями, рассеянным склерозом, ревматоидным артритом и т.д., болью, вызванной артритом, болезнью Альцгеймера и другими воспалительными заболеваниями. Сообщается, что SSAO/VAP-1 играет важную роль в биологии рака. Низкомолекулярные ингибиторы SSAO/VAP-1 подавляют неоангиогенез и уменьшают количество миелоидных лейкоцитов при меланоме и лимфоме. В последние годы исследования также показали, что SSAO играет роль в возникновении и развитии заболеваний печени, таких как жировая болезнь печени. Жировая болезнь печени может перерасти в неалкогольную жировую печень после сочетания с воспалением и прогрессированием, и у определенной части пациентов через некоторое время разовьется фиброз печени, цирроз и даже рак печени.

Учитывая, что функция SSAO играет важную роль в патологическом процессе различных заболеваний, связанных с воспалением, поиск высокоэффективных ингибиторов имеет большое значение и важность для контроля заболеваний, вызванных аномалией SSAO.

Раскрытие сущности изобретения

Цель настоящего изобретения - создать класс новых ингибиторов SSAO, а также их получение и применение.

В первом аспекте настоящего изобретения предоставляется соединение формулы I, его стереоизомеры, или рацематы, или их фармацевтически приемлемые соли



где

A может быть выбран из группы, состоящей из замещенного или незамещенного ароматического кольца C₆-C₁₀ и замещенного или незамещенного 5-12-членного гетероароматического кольца, или A представляет собой химическую связь (или ее отсутствие);

B может быть выбран из группы, состоящей из замещенного или незамещенного C₃₋₁₀циклоалкила, замещенного или незамещенного C₆-C₁₀ ароматического кольца (включая моноциклическое кольцо и конденсированное кольцо), замещенного или незамещенного 5-12-членного гетероароматического кольца (включая моноциклическое кольцо и конденсированное кольцо), и замещенного или незамещенного 3-12-членного гетероциклического кольца (включая моноциклическое кольцо, конденсированное кольцо, мостиковое кольцо и спирокольцо); причем гетероароматическое кольцо или гетероциклическое кольцо может также содержать 1-3 гетероатома, выбранных из азота, кислорода или серы;

L₁ может быть выбран из группы, состоящей из -O-, -NH-, -(C=O)-, -NH(C=O)-, -(C=O)NH-, -NHS(=O)₂-, -S(=O)₂NH- и (CR₉R₁₀)_n; в каждой из вышеуказанных групп, когда пишется слева направо, это означает, что левая сторона группы присоединена к кольцу A, а правая сторона присоединена к -CR₃R₄-;

L₂ может представлять собой химическую связь (или ее отсутствие) или группы, выбранные из группы, состоящей из -O-, -NH-, -S-, -(C=O)-, -SO₂-, -NH-(C=O)-NH-, -NH-S(=O)₂-NH-, -(S=O)-, -NH-(S=O)-NH-, -NH-(C=O)-, -(C=O)-NH-, -(CH=CH)_n-, -(C=C)_n-, -NH-S(=O)₂-, -S(=O)₂-NH-, C₃-C₈-

циклоалкила, 5-8-членного гетероциклила и $(CR_9R_{10})_n$;

L_3 может быть выбран из группы, состоящей из замещенного или незамещенного C_{3-12} карбоциклического кольца (включая моноциклическое кольцо, конденсированное кольцо, мостиковое кольцо и спирокольцо), замещенного или незамещенного 5-12-членного гетероциклического кольца (включая моноциклическое кольцо, конденсированное кольцо, мостиковое кольцо и спирокольцо) и замещенного или незамещенного 5-6-членного гетероароматического кольца; гетероциклическое кольцо может содержать 1-3 гетероатома, выбранных из азота, кислорода или серы;

R_1, R_2 каждый независимо может быть выбран из группы, состоящей из H, F и Cl;

R_3, R_4 каждый независимо может быть выбран из группы, состоящей из H, F, -OH, -CN, замещенного или незамещенного C_1-C_8 -алкила, замещенного или незамещенного C_3-C_8 -циклоалкила, замещенного или незамещенного -O- C_1-C_8 -алкила, замещенного или незамещенного -O- C_3-C_8 -циклоалкила, замещенного или незамещенного - C_6-C_{10} -арила, замещенного или незамещенного -O- C_1-C_4 -алкил- C_6-C_{10} -арила и замещенного или незамещенного -S- C_1-C_8 -алкила; или R_3 и R_4 вместе с атомами углерода, с которыми они связаны, составляют 3-8-членное карбоциклическое кольцо или 3-8-членное гетероциклическое кольцо; и когда L_1 может представлять собой -O-, -NH-, -(C=O)NH- или -S(=O)₂NH-, ни R_3 , ни R_4 могут не являться группой, выбранной из группы, состоящей из -OH, замещенного или незамещенного -O- C_1-C_8 -алкила, замещенного или незамещенного -O- C_3-C_8 -циклоалкила, замещенного или незамещенного -O- C_1-C_4 -алкил- C_6-C_{10} -арила и замещенного или незамещенного -S- C_1-C_8 -алкила;

R_5, R_6 каждый независимо может представлять собой водород или R_5 и R_6 вместе с атомом азота, с которым они связаны, способны составлять замещенное или незамещенное 5-6-членное азотсодержащее гетероциклическое кольцо; или каждый независимо может представлять собой -NR_aR_b, где R_a и R_b каждый независимо может представлять собой H, - C_1-C_8 -алкил, замещенный или незамещенный C_3-C_8 -циклоалкил, - C_1-C_4 -алкил- C_6-C_{10} -арил, или R_a и R_b вместе с атомом азота, с которыми они связаны, могут составлять 5-6-членное азотсодержащее гетероциклическое кольцо;

R_7 может быть выбран из следующей группы: замещенные или незамещенные группы, выбранные из группы, состоящей из C_5-C_6 -циклоалкила, 5-6-членного гетероциклического кольца, содержащего 1 атом азота, 4-6-членного гетероциклического кольца, содержащего 1 атом кислорода, C_1-C_6 -фторалкоксила, (C_1-C_6 -алкоксил) C_1-C_6 -алкоксила, C_1-C_6 -алкилкарбонила, C_2-C_6 -ациламино, (C_1-C_6 -алкил)NH- и (C_1-C_6 -алкил) (C_1-C_6 -алкил)N-; замещенный означает, что группы замещены группой, выбранной из группы, состоящей из C_1-C_6 -алкоксила, C_1-C_6 -алкилкарбонила, 5-12-членного гетероароматического кольца (моноциклического, сопряженного кольца или конденсированного кольца) и C_6-C_{12} ароматического кольца (моноциклического, сопряженного кольца, конденсированного кольца);

или R_7 может быть выбран из группы, состоящей из H, замещенного или незамещенного C_1-C_6 -алкоксила, и L_3 может быть выбран из группы, состоящей из замещенного или незамещенного 5-12-членного мостикового кольца и 5-12-членного кислородсодержащего спирогетероциклического кольца;

R_8 и R_8' каждый независимо может быть выбран из группы, состоящей из H, F, Cl, Br, -NO₂, -OH, -CN, замещенного или незамещенного C_1-C_8 -алкила, замещенного или незамещенного C_3-C_8 -циклоалкила, замещенного или незамещенного -O- C_1-C_8 -алкила, замещенного или незамещенного -O- C_3-C_8 -циклоалкила, замещенного или незамещенного - C_6-C_{10} -арила, замещенного или незамещенного -O- C_1-C_4 -алкил- C_6-C_{10} -арила, замещенного или незамещенного -S- C_1-C_8 -алкила, -NR_aR_b, -NHR_c, -SO₂-(C_1-C_8 -алкил) и -CONR_aR_b; где R_a и R_b каждый независимо может представлять собой H, - C_1-C_8 -алкил, - C_1-C_4 -алкил- C_6-C_{10} -арил, или R_a и R_b вместе с атомом азота, с которым они связаны, могут составлять 5-6-членное азотсодержащее гетероциклическое кольцо; R_c может быть выбран из группы, состоящей из -C(=O)-(C_1-C_8 -алкил) и -C(=O)-(C_6-C_{10} -арил);

R_9, R_{10} каждый независимо может быть выбран из группы, состоящей из H, C_1-C_8 -алкила, -O- C_1-C_8 -алкила, -O- C_3-C_8 -циклоалкила, - C_6-C_{10} -арила, -O- C_1-C_4 -алкил- C_6-C_{10} -арила, -S- C_1-C_8 -алкила, -CF₃, -S-CF₃, -OCF₃, -OCH₂CF₃, F, -OH и -CN; или R_9 и R_{10} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, могут составлять группу, выбранную из группы, состоящей из C_3-C_8 -циклоалкила и 5-12-членного гетероциклила;

X может быть выбран из группы, состоящей из -(C=O)-, -(C=O)-NH- и -CR₁₁R₁₂;

R_{11}, R_{12} каждый независимо может быть выбран из группы, состоящей из H, F, -OH, -CN, замещенного или незамещенного C_1-C_8 -алкила, замещенного или незамещенного C_3-C_8 -циклоалкила, замещенного или незамещенного -O- C_1-C_8 -алкила, замещенного или незамещенного -O- C_3-C_8 -циклоалкила, замещенного или незамещенного - C_6-C_{10} -арила, замещенного или незамещенного -O- C_1-C_4 -алкил- C_6-C_{10} -арила и замещенного или незамещенного -S- C_1-C_8 -алкила; или R_{11} и R_{12} вместе с атомами углерода, с которыми они связаны, составляют 3-8-членное карбоциклическое кольцо или 3-8-членное гетероциклическое кольцо;

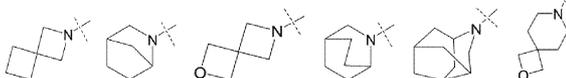
при условии, что указанные выше группы составляют химически стабильную структуру;

если не указано иное, вышеупомянутый "замещенный" означает один или несколько атомов водорода в группе, замещены заместителем, выбранным из группы, состоящей из оксо (=O), гидроксидила, замещенного или незамещенного C_5-C_6 -циклоалкила, замещенного или незамещенного 5-6-членного гетероциклического кольца, содержащего 1 атом азота, 4-6-членного гетероциклического кольца, содержа-

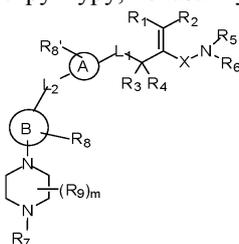
шего 1 атом кислорода, C₁-C₆-алкила, C₁-C₆-алкоксила, C₁-C₆-фторалкоксила, C₁-C₆-алкоксил-C₁-C₆-алкоксила, C₁-C₆-алкилкарбонила, C₂-C₆-ациламино, C₁-C₆-алкил NH-, (C₁-C₆-алкил) (C₁-C₆-алкил) N-; замещение означает, что указанная выше группа замещена группой, выбранной из группы, состоящей из C₁-C₆-алкоксила и C₁-C₆-алкилкарбонила.

5-12-членный кислородсодержащий гетероцикл спирокольца может представлять собой спироцикл, выбранный из группы, состоящей из кислородсодержащего спиро[3,3]кольца, кислородсодержащего спиро[3,4]кольца, кислородсодержащего спиро[3,5]кольца, кислородсодержащего спиро[3,6]кольца и кислородсодержащего спиро[4,5]кольца.

L₃ может представлять собой структуру, выбранную из группы, состоящей из пиперазинового

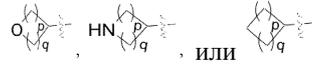
кольца,  и, в то время как L₃ может быть замещенным или незамещенным.

Соединение формулы I может иметь структуру, показанную на следующей формуле:

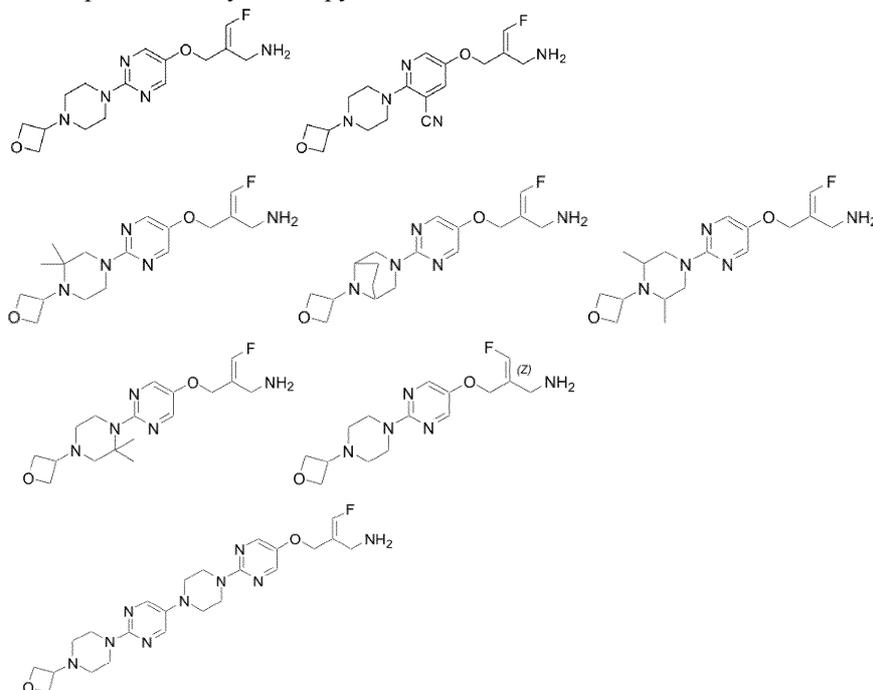


где m равно 0, 1, 2, 3 или 4.

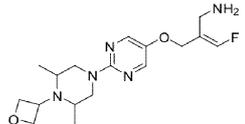
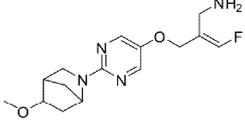
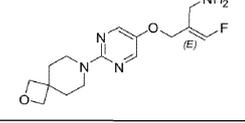
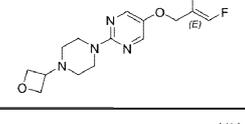
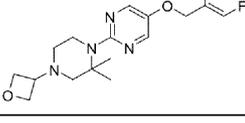
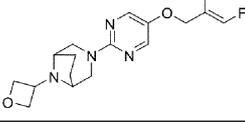
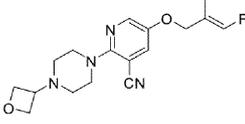
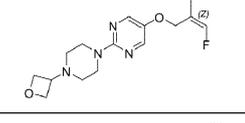
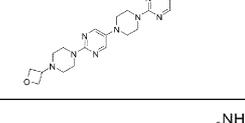
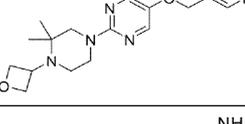
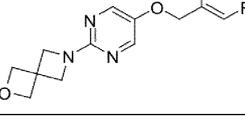
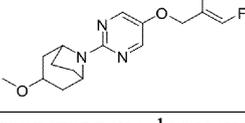
R₇ может быть выбран из группы, состоящей из замещенного или незамещенного C₅-C₆-циклоалкила, 5-6-членного гетероциклического кольца, содержащего 1 атом азота, 4-6-членного гетероциклического кольца, содержащего 1 атом кислорода, 5-12-членного гетероароматического кольца (моноклическое, сопряженное кольцо или конденсированное кольцо); или R₇ может быть выбран из группы, состоящей из H, замещенного или незамещенного C₁-C₆-алкоксила, и L₃ может быть выбран из группы, состоящей из замещенного или незамещенного 5-12-членного мостикового кольца и 5-12-членного кислородсодержащего спирогетероциклического кольца.

R₇ может быть выбран из группы, состоящей из ; где каждый из p и q независимо может быть выбран из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3 и 4, а сумма p и q ≥ 1.

Соединение выбрано из следующей группы:



Соединение может быть выбрано из следующей группы:

Номер соединения	Структура соединения
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	

Во втором аспекте настоящего изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержа-

шая терапевтически эффективное количество соединения согласно первому аспекту настоящего изобретения или его стереоизомеров, или рацематов, или их фармацевтически приемлемых солей, и фармацевтически приемлемый наполнитель.

Фармацевтическая композиция может использоваться для предотвращения и/или лечения заболеваний, связанных с SSAO или регулируемых белком SSAO/VAP-1; заболевания могут быть выбраны из группы, состоящей из воспалительных заболеваний и/или заболеваний, связанных с воспалением, диабета и/или заболеваний, связанных с диабетом, психических расстройств, ишемических заболеваний, сосудистых заболеваний, глазных заболеваний, фиброза, нейровоспалительных заболеваний, рака, связанных с болью заболеваний или отторжения тканевого трансплантата.

Воспалительные заболевания и/или заболевания, связанные с воспалением, могут быть выбраны из группы, состоящей из артрита (включая ювенильный ревматоидный артрит) и боли, вызванной артритом, болезни Крона, язвенного колита, воспалительного заболевания кишечника (например, синдром раздраженного кишечника), псориаза, астмы, пневмонии, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), бронхоэктаза, воспаления кожи, заболевания глаз, контактного дерматита, гепатита, аутоиммунного заболевания печени, аутоиммунного гепатита, первичного билиарного цирроза, склерозирующего холангита, аутоиммунного холангита, алкогольного холангита, атеросклероза, хронической сердечной недостаточности, застойной сердечной недостаточности, ишемической болезни, инсульта и его осложнений, инфаркта миокарда и его осложнений, разрушение воспалительных клеток после инсульта, синовита, системного воспалительного сепсиса и т.д.

Боль может быть выбрана из группы, состоящей из мышечной боли, боли в костях и при артрите, невропатической боли, боли, вызванной опухолью, боли в пояснице, воспалительной боли и т.д.

Глазные заболевания могут представлять собой увеит или дегенерацию желтого пятна.

Фиброз может быть выбран из группы, состоящей из муковисцидоза, идиопатического фиброза легких, фиброза печени, включая неалкогольную жировую болезнь печени, такую как неалкогольный стеатогепатит (NASH), и вызванный алкоголем фиброз, вызывающий цирроз печени, почечного фиброза, склеродермии, радиационно-индуцированного фиброза и осложнения, вызванные фиброзом.

Нейровоспалительные заболевания могут быть выбраны из группы, состоящей из инсульта, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, сосудистой деменции, рассеянного склероза, хронического рассеянного склероза и т.д.

Рак может быть выбран из группы, состоящей из рака легких, рака груди, рака толстой и прямой кишки, рака анального канала, рака поджелудочной железы, рака простаты, рака яичников, рака печени и желчных протоков, рака пищевода, неходжкинской лимфомы, рака мочевого пузыря, рака матки, глиомы, глиобластомы, медуллобластомы и других опухолей головного мозга, рака почки, рака головы и шеи, рака желудка, множественной миеломы, тестикулярного рака, герминогенной опухоли, нейроэндокринной опухоли, рака шейки матки, доброкачественных опухолей желудочно-кишечного тракта, груди и других органов, перстневидно-клеточной карциномы, мезенхимно-клеточных опухолей, включая саркому, фибросаркому, гемангиому, ангиоматоз, гемангиоперицитому, псевдоангиоматозную стромальную гиперплазию, миофибробластому, фиброматоз, воспалительную миофибробластому, липому, ангиолипому, гранулезоклеточной опухоли яичника, фибронейромы, невриномы, ангиосаркомы, липосаркомы, рабдомиосаркомы, остеосаркомы, лейомиомы или лейомиосаркомы.

Диабетом и/или связанными с диабетом заболеваниями могут быть диабет I типа, диабет II типа, синдром X, диабетическая ретинопатия, диабетическая нефропатия, диабетическая невропатия или диабетический отек желтого пятна.

Психические расстройства могут представлять собой тяжелую депрессию, биполярную депрессию или синдром нарушения внимания с гиперактивностью.

Ишемические заболевания могут представлять собой инсульт и/или его осложнения, инфаркт миокарда и/или его осложнения или повреждение тканей воспалительными клетками после инсульта.

Сосудистые заболевания могут представлять собой атеросклероз, хроническую сердечную недостаточность или застойную сердечную недостаточность.

Артрит может представлять собой остеоартрит, ревматический артрит, ревматоидный артрит или ювенильный ревматоидный артрит.

Системный воспалительный синдром может представлять собой системный воспалительный сепсис.

Воспалительное заболевание кишечника может представлять собой заболевание раздраженного кишечника.

Заболевания печени могут представлять собой аутоиммунное заболевание печени, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, склерозирующий холангит, аутоиммунный холангит, алкогольную болезнь печени или неалкогольную жировую болезнь печени.

Респираторные заболевания могут представлять собой астму, острое повреждение легких, острый респираторный дистресс-синдром, воспаление легких, хроническую обструктивную болезнь легких, бронхит или бронхоэктазию.

Глазные заболевания могут представлять собой увеит, ирит, ретинит, аутоиммунное глазное воспа-

ление, воспаление или дегенерацию желтого пятна, вызванные ангиогенезом и/или лимфогенезом.

Кожные заболевания могут представлять собой контактный дерматит, воспаление кожи, псориаз или экзему.

Нейровоспалительными заболеваниями могут быть болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, сосудистая деменция, рассеянный склероз или хронический рассеянный склероз.

Неалкогольными жировыми болезнями печени являются простую неалкогольную болезнь печени, неалкогольный стеатогепатит, криптогенный цирроз печени, связанный с неалкогольной жировой болезнью печени, или первичный рак печени.

В третьем аспекте настоящего изобретения предлагается применение соединения согласно первому аспекту настоящего изобретения или его стереоизомеров, или рацематов, или их фармацевтически приемлемых солей, или фармацевтической композиции согласно второму аспекту настоящего изобретения, при этом он используется для приготовления лекарственных средств для профилактики и/или лечения заболеваний, связанных с SSAO или регулируемых белком или активностью SSAO/VAP-1.

Заболевания, связанные с SSAO или регулируемые белком или активностью SSAO/VAP-1, могут быть выбраны из группы, состоящей из воспалительных заболеваний и/или заболеваний, связанных с воспалением, диабета и/или заболеваний, связанных с диабетом, психических расстройств, ишемических заболеваний, сосудистых заболеваний, глазных заболеваний, фиброза, нейровоспалительных заболеваний, рака, фиброза или отторжения тканевого трансплантата.

В одном варианте осуществления способа и применения настоящей заявки заболевания могут представлять собой вызванные диабетом заболевания, выбранные из диабетической нефропатии, гломерулосклероза, диабетической ретинопатии, неалкогольной жировой болезни печени и неоваскуляризации хориоидеи.

В другом варианте осуществления способа и применения настоящей заявки заболевания могут представлять собой нейровоспалительные заболевания. В других вариантах осуществления способов и применений настоящей заявки заболевания могут быть выбраны из фиброза печени, цирроза печени, фиброза почек, идиопатического фиброза легких и фиброза, индуцированного облучением. В других вариантах реализации способа и применения настоящей заявки заболевание может представлять собой рак.

Следует понимать, что в рамках настоящего изобретения вышеупомянутые технические характеристики в данном документе и технические характеристики, конкретно описанные ниже (такие как примеры), могут быть объединены друг с другом, тем самым составляя новые или технические решения, которые не нужно здесь снова указывать.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показаны результаты фармакодинамического исследования соединений SSAO в биологическом исследовании согласно примеру 6 на модели заболевания, связанного с глазным воспалением;

На фиг. 2 показано влияние соединения по настоящему изобретению на экспрессию генов воспалительного сигнального пути в сетчатке на модели воспалительного заболевания, индуцированного LPS, у крыс.

Осуществление изобретения

Изобретатель впервые обнаружил класс низкомолекулярных ингибиторов SSAO после обширных и глубоких исследований. Настоящее изобретение было выполнено на этой основе.

Термины

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит это изобретение.

Используемые здесь термины "содержащий" или "состоящий (включающий)" могут быть открытой формой, полузакрытой формой и закрытой формой. Другими словами, эти термины также включают "в основном состоящий из" или "состоящий из".

Используемый здесь термин "алкил" относится к полностью насыщенной группе с прямой или разветвленной углеводородной цепью, состоящей только из атомов углерода и водорода и связанной с остальной частью молекулы одинарной связью; имеющей, например, от 1 до 12 (предпочтительно от 1 до 8, более предпочтительно от 1 до 6) атомов углерода, такой как метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил, 2-метилбутил, 2,2-диметилпропил, н-гексил, гептил, 2-метилгексил, 3-метилгексил, октил, нонил и децил и т.п., но не ограничивается ими. Для целей настоящего заявки термин "C₁-C₆-алкил" относится к алкильным группам, содержащим от 1 до 6 атомов углерода.

Используемый здесь термин "алкоксил" относится к алкилокси. Алкильная группа такая, как определено выше.

Используемый здесь термин "циклоалкил" относится к циклическим алкильным группам, состоящим только из атомов углерода и атомов водорода. Например, включая, но не ограничиваясь ими, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и т.д., циклоалкильная группа может необязательно иметь конденсированное кольцо, спирокольцо или мостиковую кольцевую структуру. "C₃-C₅-циклоалкил" относится к циклическим алкильным группам, имеющим от 3 до 5 атомов углерода; "C₅-C₆-

циклоалкил" относится к циклическим алкильным группам, имеющим от 5 до 6 атомов углерода.

Термин "5-12-членный гетероциклический" или "5-12-членное гетероциклическое кольцо" как группа или часть других групп в данном документе относится к стабильным 5-12-членным неароматическим циклическим группам, состоящим из атомов углерода и 1-3 гетероатомов, выбранных из азота, кислорода, серы. Если в описании не указано иное, гетероциклический может быть моноциклической, бициклической, трициклической или более кольцевой системой, которая может включать конденсированную кольцевую систему, мостиковую кольцевую систему или спирокольцевую систему; атомы азота, углерода или серы в гетероциклической группе необязательно могут быть окислены; атомы азота необязательно могут быть кватернизованы; гетероциклический может быть частично или полностью насыщенным. Гетероциклический может быть связан с остальной частью молекулы одинарной связью через атом углерода или гетероатом. В конденсированных кольцах, содержащих гетероциклический, одно или несколько колец могут быть арилом или гетероарилом, как определено ниже, при условии, что мостик с остальной частью молекулы представляет собой неароматические кольцевые атомы. Примеры гетероциклических групп включают, но не ограничиваются ими: тетрагидропирролил, морфолинил, пиперазинил, пиперидинил, тиоморфолинил, 2,7-диазааспиро[3.5]нонан-7-ил, 2-окса-6-азаспиро[3.3]гептан-6-ил, 2,5-диазабицикло[2.2.1]гептан-2-ил, азетидинил, пиранил, тетрагидропиранил, тиопиранил, тетрагидрофуранил, оксазинил, диоксанил, тетрагидроизохинолинил, декагидроизолидизохинолинил, имидазолинил, имидазолидинил, хиназинил, тиазолидинил, изотиазолидинил, изоксазолидинил, индолин, октагидроиндолил, октагидроизоиндолил, пирролидинил, пирозолидинил, фталимидо и др.

Используемый здесь термин "5-6-членное гетероциклическое кольцо, содержащее 1 атом азота" относится к 5- или 6-членным гетероциклическим кольцам, содержащим только один атом азота в кольце.

Используемый здесь термин "4-6-членное гетероциклическое кольцо, содержащее 1 атом кислорода" относится к 4-членным, 5-членным или 6-членным гетероциклическим кольцам, содержащим только один атом кислорода в кольце.

Используемый здесь термин "5-6-членное ароматическое кольцо" относится к 5- или 6-членным ароматическим кольцам.

Используемый здесь термин "5-6-членное гетероароматическое кольцо" относится к 5- или 6-членным ароматическим кольцам, имеющим от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из азота, серы и кислорода.

Используемый здесь термин "галоген" относится к фтору, хлору, бромю или йоду.

Соединения по настоящему изобретению

Соединения по настоящей заявке могут представлять собой соединение в соответствии с формулой I или его стереоизомеры или рацематы, или его фармацевтически приемлемые соли.

Соединения по настоящей заявке могут содержать один или несколько хиральных атомов углерода и, следовательно, могут составлять энантиомеры, диастереомеры и другие стереоизомерные формы. Каждый хиральный атом углерода может быть определен как (R)- или (S)- на основе стереохимии. Настоящая заявка предполагает раскрытие всех возможных изомеров, а также их рацематов и их оптически чистых форм. Для получения указанных здесь соединений рацематы, диастереомеры или энантиомеры могут быть выбраны в качестве исходных материалов или промежуточных продуктов. Оптически активные изомеры могут быть получены с использованием хиральных синтонов или хиральных реагентов, или могут быть разделены с использованием общепринятых методов, таких как кристаллизация и хиральная хроматография и т. д.

Общепринятые методы получения/разделения индивидуальных изомеров включают хиральный синтез из подходящих оптически чистых предшественников или разделение рацематов (или рацематов солей или производных) с использованием, например, хиральной высокоэффективной жидкостной хроматографии, см., например, Gerald Gübitz and Martin G. Schmid (Eds.), *Chiral Separations, Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 243, 2004; A.M. Stalcup, *Chiral Separations, Annu. Rev. Anal. Chem.* 3:341-63, 2010; Fumiss et al. (eds.), *VOGEL'S ENCYCLOPEDIA OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY* 5.sup. TH ED., Longman Scientific and Technical Ltd., Essex, 1991, 809-816; Heller, *Acc. Chem. Res.* 1990, 23, 128.

Термин "фармацевтически приемлемые соли" включает фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли и фармацевтически приемлемые основно-аддитивные соли.

"Фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли" относятся к солям, образованным с неорганической кислотой или органической кислотой, которые могут сохранять биологическую эффективность свободного основания без других побочных эффектов. Соли неорганических кислот включают, но не ограничиваются ими, гидрохлорид, гидробромид, сульфат, нитрат, фосфат и т.д.; соли органических кислот включают, но не ограничиваются ими, формиат, ацетат, 2,2-дихлорацетат, трифторацетат, пропионат, капронат, каприлат, капрат, ундециленат, гликолят, глюконат, лактат, себацинат, адипат, глутарат, малонат, оксалат, малеат, сукцинат, фумарат, тартрат, цитрат, пальмитат, стеарат, олеат, циннамат, лаурат, малат, глутамат, пироглутамат, аспарат, бензоат, метансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат, альгинат, аскорбат, салицилат, 4-аминосалицилат, нафталиндисульфонат и др. Эти соли могут быть получены способами, известными в данной области.

"Фармацевтически приемлемые основно-аддитивные соли" относятся к солям, образованным с неорганическим основанием или органическим основанием, которые могут сохранять биологическую эффективность свободной кислоты без других побочных эффектов. Соли, полученные из неорганических оснований, включают, но не ограничиваются ими, натрий, калий, литий, аммоний, кальций, магний, железо, цинк, медь, марганец, алюминий и тому подобное. Неорганическими солями в данной заявке могут быть соли аммония, натрия, калия, кальция и магния. Соли, полученные из органических оснований, включают, но не ограничиваются ими, следующие соли: первичные амины, вторичные амины и третичные амины, замещенные амины, включая природные замещенные амины, циклические амины и основные ионообменные смолы, такие как аммиак, изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, триэтиламин, трипропиламин, этаноламин, диэтанолламин, триэтанолламин, диметилэтанолламин, 2-диметиламиноэтанол, 2-диэтиламиноэтанол, дициклогексиламин, лизин, аргинин, гистидин, кофеин, прокаин, холин, бетаин, этилендиамин, глюкозамин, метилглюкозамин, теобромин, пурин, пиперазин, пиперидин, N-этилпиперидин, полиаминовая смола и др. Про настоящей заявке органические основания могут представлять собой изопропиламин, диэтиламин, этаноламин, триметиламин, дициклогексиламин, холин и кофеин. Эти соли можно получить способами, известными в данной области.

Способы получения

Следующая схема реакции в качестве примера иллюстрирует способ получения соединения формулы I, или его стереоизомера, или рацемата, или его фармацевтически приемлемых солей, где каждая группа является такой, как описано выше. Следует понимать, что комбинации заместителей и/или переменных в формуле допустимы только тогда, когда такие комбинации приводят к стабильным соединениям в следующих схемах реакций. Также следует понимать, что другая формула может быть получена специалистами в области органической химии способами, раскрытыми в данном документе (путем применения соответственно замещенных исходных материалов и изменения параметров синтеза, если необходимо, с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области техники) или известными способами.

Специалисты в данной области также должны понимать, что некоторые функциональные группы промежуточных соединений могут нуждаться в защите соответствующими защитными группами в способах, описанных ниже. Такие функциональные группы включают гидроксил, amino, меркапто и карбоновую кислоту. Подходящие защитные группы для гидроксигруппы включают триалкилсилил или диалкилсилил (например, трет-бутилдиметилсилил, трет-бутилдифенилсилил или триметилсилил), тетрагидропиранил, бензил и т.д. Подходящие защитные группы для amino, амидино и гуанидино включают трет-бутоксикарбонил, бензилоксикарбонил и т.д. Подходящие защитные группы для сульфгидрила включают -C(O)-R" (где R" представляет собой алкил, арил или аралкил), p-метоксибензил, тритил и т.д. Подходящие карбоксизащитные группы включают алкиловые, ариловые или арилалкиловые сложные эфиры.

Защитные группы могут быть введены и удалены в соответствии со стандартной методикой, известной специалистам в данной области, и как описано здесь. Применение защитных групп подробно описано в Greene, T. W. and P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, (1999), 4th Ed., Wiley. Защитные группы также могут быть полимерными смолами.

Применение

Соединения согласно настоящей заявке могут обладать превосходной ингибирующей активностью SSAO и могут использоваться в фармацевтической композиции с соединениями согласно настоящей заявке в качестве активного ингредиента для предотвращения и/или лечения заболеваний, связанных с SSAO или регулируемых белком SSAO/VAP-1, такими как атеросклероз, диабет и его осложнения, ожирение, инсульт, хроническое заболевание почек, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), аутоиммунное заболевание, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, боль, вызванная артритом, болезнь Альцгеймера, глазные заболевания, заболевания печени (такие как стеатоз печени, гепатит, фиброз печени, цирроз печени, рак печени).

В заявке термин "фармацевтическая композиция" относится к препаратам соединений и средам, общепринятым в данной области, для доставки биологически активных соединений млекопитающим (таким как человек). Среда включает фармацевтически приемлемый носитель. Назначение фармацевтической композиции состоит в том, чтобы способствовать введению в организм, что способствует абсорбции активного ингредиента и, таким образом, проявлять биологическую активность.

В заявке термин "фармацевтически приемлемый" относится к веществу (например, носителям или разбавителям), которое не влияет на биологическую активность или свойства соединения и является относительно нетоксичным, то есть вещество можно вводить пациентам, не вызывая нежелательных биологических реакций или взаимодействий с любыми компонентами, включенными в композицию, нежелательным образом.

В заявке термин "фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества" включает, но не ограничивается ими, любые адъюванты, носители, вспомогательные вещества, вещества, способствующие скольжению, подсластители, разбавители, консерванты, красители/пигменты, ароматизаторы, поверхностно-активные вещества, смачивающие агенты, диспергаторы, суспендирующие агенты, стабилизаторы,

изотонические агенты, растворители или эмульгаторы, приемлемые для использования людьми или домашним скотом, одобренные соответствующими государственными органами.

В заявке термины "профилактический", "предотвращение" и "предотвращающий" включают уменьшение вероятности возникновения или ухудшения состояния глаз у пациентов.

В заявке термин "лечение" и другие подобные синонимы включают следующие значения:

(i) предотвращение возникновения заболевания или состояния у млекопитающих, особенно когда такие млекопитающие восприимчивы к заболеванию или состоянию, но не были диагностированы как страдающие этим заболеванием или состоянием;

(ii) подавление болезни или состояния, то есть сдерживание развития;

(iii) облегчение болезни или состояния, то есть отступление от состояния болезни или состояния; или

(iv) ослабление симптомов, вызванных заболеванием или состоянием.

В заявке термин "эффективное количество", "терапевтически эффективное количество" или "фармацевтически эффективное количество" относится к количеству, по меньшей мере, одного агента или соединения, которое достаточно для облегчения одного или нескольких симптомов заболевания или состояния, от которого лечатся в некоторой степени после введения. Результатом может быть уменьшение и/или облегчение признаков, симптомов или причин, или любые другие желаемые изменения в биологической системе. Например, "эффективное количество" для лечения - это количество композиции, содержащей описанное здесь соединение, необходимое для клинического обеспечения значительного облегчения заболевания. Для определения эффективного количества, подходящего для каждого отдельного случая, можно использовать такие методы, как тесты на повышение дозы.

В заявке термины "введение", "вводить", "введенный" и т.п. относятся к способам доставки соединений или композиций в желаемое место для биологического действия. Эти способы включают, но не ограничиваются ими, пероральный путь, трансдуоденальный путь, парентеральную инъекцию (включая внутривенную, подкожную, внутривнутрибрюшинную, внутримышечную, внутриартериальную инъекцию или инфузию), местное введение и ректальное введение. Специалисты в данной области знакомы с техникой введения, которую можно использовать для соединений и способов, описанных здесь, например, описанных в Goodman and Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, current ed.; Pergamon; and Remington's, *Pharmaceutical Sciences* (current edition), Mack Publishing Co., Easton, Pa. Обсуждаемые здесь соединения и композиции можно вводить перорально.

В заявке термины "комбинация лекарственных средств", "лекарственные средства комбинированного применения", "комбинированное лекарственное средство", "введение других лечебных средств", "введение других терапевтических средств" и т.д. относятся к медицинскому лечению, полученному путем смешивания или объединения более чем одного активного ингредиента, который включает фиксированные и нефиксированные комбинации активных ингредиентов. Термин "фиксированная комбинация" относится к одновременному введению по меньшей мере одного соединения, описанного в данном документе, и по меньшей мере одного синергетического средства пациентам в форме единого или единой лекарственной формы. Термин "нефиксированная комбинация" относится к одновременному введению, комбинированному введению или последовательному введению с переменными интервалами по меньшей мере одного соединения, описанного в данном документе, и по меньшей мере одного синергетического агента пациенту в форме отдельных единиц. Это также относится к коктейльной терапии, такой как введение трех или более активных ингредиентов.

Относительная ингибирующая эффективность соединений может быть измерена количеством, необходимым для ингибирования активности аминоксидазы SSAO/VAP-1 различными способами, например, в исследованиях *in vitro* с использованием рекомбинантного человеческого белка или рекомбинантных нечеловеческих ферментов, клеточных исследованиях с использованием клеток, экспрессирующих нормальные ферменты грызунов, исследованиях на клетках, трансфицированных человеческим белком, исследованиях *in vivo* на грызунах и других млекопитающих и т.д.

Также раскрыты способы ингибирования SSAO/VAP-1 у пациентов, страдающих воспалительными заболеваниями и получающих лечение воспалительных заболеваний с использованием соединений, описанных формулами I и II. Воспалительные заболевания человека включают артрит и боль, вызванные артритом, болезнь Крона, синдром раздраженного кишечника, псориаз, астму, хроническую обструктивную болезнь легких, бронхоэктаз, склероз суставов, воспаление, вызванное диабетом, и разрушение воспалительных клеток после инсульта.

Следовательно, в настоящей заявке раскрывается способ ингибирования аминоксидазы у людей, нуждающихся в этом. Способ включает введение эффективного количества соединения формулы I или формулы II пациенту для получения положительных терапевтических ответов.

Кроме того, в настоящей заявке раскрывается способ лечения заболеваний, связанных с аминоксидазой. Способ включает введение терапевтически эффективного количества соединения формулы I или формулы II нуждающимся в этом людям.

Также в настоящей заявке раскрывается способ лечения заболеваний, регулируемых SSAO/VAP-1. Способ включает введение терапевтически эффективного количества соединения формулы I или формулы II нуждающимся в этом людям.

лы II нуждающимся в этом людям.

Вышеупомянутый способ применим там, где заболеванием является воспаление. В данном контексте "воспаление" включает различные показания, включая артрит (включая ювенильный ревматоидный артрит), болезнь Крона, язвенный колит, воспалительное заболевание кишечника (например, синдром раздраженного кишечника), псориаз, астму, пневмонию, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), бронхоэктаз, воспаление кожи, глазные заболевания, контактный дерматит, гепатит, аутоиммунное заболевание печени, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, склерозирующий холангит, аутоиммунный холангит, алкогольная болезнь печени, атеросклероз, хроническая сердечная недостаточность, застойная сердечная недостаточность, ишемическая болезнь, инсульт и его осложнения, инфаркт миокарда и его осложнения, разрушение воспалительных клеток после инсульта, синовит, системный воспалительный сепсис и т.д.

Вышеупомянутый способ также можно применить, когда заболевания представляют собой диабет I типа, диабет II типа и их осложнения.

Вышеупомянутый способ также можно применить, когда заболевания представляют собой дегенерацию желтого пятна и/или другие глазные заболевания.

Вышеупомянутый способ также можно применить при фиброзе. Используемый здесь термин "фиброз" включает такие заболевания, как муковисцидоз, идиопатический фиброз легких, фиброз печени, включая неалкогольную жировую болезнь печени, такую как неалкогольный стеатогепатит (NASH) и вызванный алкоголем фиброз, вызывающий цирроз печени, фиброз почек, склеродермию, радиационно-индуцированный фиброз и другие заболевания, при которых чрезмерный фиброз способствует патологии заболевания.

Вышеупомянутый способ можно применить также для лечения нейровоспалительных заболеваний. Используемый здесь термин "нейровоспалительные заболевания" включает различные показания, включая инсульт, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, сосудистую деменцию, рассеянный склероз, хронический рассеянный склероз и т.д.

Вышеупомянутый способ также можно применить к связанным с болью заболеваниям, выбранным, но не ограничиваясь ими, из следующей группы: мышечная боль, боль в костях и при артрозе, невропатическая боль, боль, вызванная опухолью, поясничная боль и боль в спине, воспалительная боль и т.д.

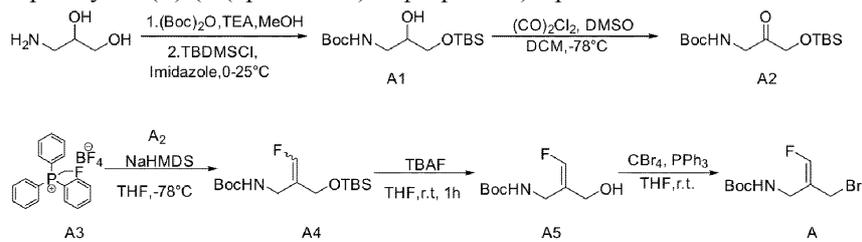
Вышеупомянутый способ также можно применить при лечении рака. Рак может быть выбран из рака легких, рака груди, рака толстой и прямой кишки, рака анального канала, рака поджелудочной железы, рака простаты, рака яичников, рака печени и желчных протоков, рака пищевода, неходжкинской лимфомы, рака мочевого пузыря, рака матки, глиомы, глиобластомы, медуллобластомы и других опухолей головного мозга, рака почек, рака головы и шеи, рака желудка, множественной миеломы, тестикулярного рака, герминогенной опухоли, нейроэндокринной опухоли, рака шейки матки, доброкачественных опухолей желудочно-кишечного тракта, молочной железы и других органов, перстневидно-клеточной карциномы, мезенхимно-клеточной опухоли, включая саркому, фибросаркому, гемангиому, ангиоматоз, гемангиоперицитому, псевдоангиоматозную стромальную гиперплазию, миофибробластому, фиброматоз, воспалительную миофибробластому, липому, ангиолипому, гранулезоклеточную опухоль, фибронейрому, невриному, ангиосаркому, липосаркому, рабдомиосаркому, остеосаркому, лейомиому или лейомиосаркому.

Раскрытые изобретения будут дополнительно проиллюстрированы ниже со ссылкой на конкретные примеры. Следует понимать, что эти примеры предназначены только для иллюстрации изобретения, но не для ограничения объема изобретения. Экспериментальные способы без особых условий, описанные в следующих примерах, обычно выполняются в общепринятых условиях или в соответствии с инструкциями производителя. Если не указано иное, процентное содержание и части рассчитываются по массе.

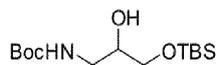
Экспериментальные материалы и реагенты, используемые в следующих примерах, могут быть получены из коммерческих каналов, если не указано иное.

Способ синтеза промежуточного продукта следующий:

Пример A: трет-бутил (E)-(2-(бромметил)-3-фтораллил)карбамат



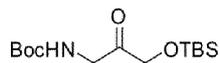
Пример A1:



К раствору 3-аминопропан-1,2-диола (400 г, 4395,6 ммоль) и триэтиламина (665,9 г, 6593,4 ммоль) в

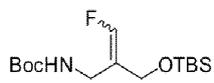
метаноле (4 л) при перемешивании добавляли ди-трет-бутилдикарбонат (1040,1 г, 4835,2 ммоль) при 0-10°C. Реакционный раствор перемешивали при 25°C в течение 2 ч, концентрировали при пониженном давлении до полного отсутствия метанола. Остаток растворяли в дихлорметане (5 л), затем добавляли имидазол (448,6 г, 6593,4 ммоль). При 0-10°C раствор TBDMSCl (791,2 г, 5274,7 ммоль) в дихлорметане (1 л) медленно добавляли по каплям в вышеуказанный раствор. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч после добавления и затем добавляли 1% раствор лимонной кислоты (2 л). Органическую фазу отделяли, дважды промывали насыщенным раствором соли, сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали в вакууме, получая бесцветное масло. Масло растворяли в н-гептане (5 л), промывали 5%-ным раствором соли до тех пор, пока не исчезли имидазол и триэтиламин, сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали в вакууме, получая сырой продукт в виде бесцветного масла (1206,6 г, 91%).

Пример A2:



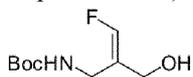
К раствору оксалилхлорида (203,4 г, 1603,2 ммоль) в безводном дихлорметане (3000 мл) медленно добавляли безводный ДМСО (158,4 г, 2030,8 ммоль) в атмосфере азота при -78°C (примечание: большое количество CO и CO₂ было выпущено, а температура не должна превышать -60°C). После добавления реакционный раствор перемешивали при -78°C в течение 30 мин, затем раствор соединения 1-4 (326,0 г, 1068,8 ммоль) в сухом дихлорметане (500 мл) медленно по каплям добавляли в реакционный раствор при -78°C. Кроме того, реакционный раствор перемешивали при -78°C в течение еще 1 ч. Далее медленно добавляли триэтиламин (545,1 г, 5344,0 ммоль) (влажность должна контролироваться) при -78°C. После добавления реакционный раствор нагревали до комнатной температуры, перемешивали в течение 1 ч и контролировали с помощью ТСХ. После исчезновения исходных веществ к реакционному раствору добавляли воду (1000 мл), органический слой отделяли и водный слой экстрагировали дихлорметаном (200 мл×2). Органические слои объединяли, сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали в вакууме, получая сырой продукт. Неочищенный продукт растворяли в 3 л н-гептана, промывали 3% раствором соли до полного отсутствия триэтиламина и очищали перегонкой с получением указанного в заголовке соединения A2 (бесцветное масло, 225,0 г, 70,1%).

Пример A4:



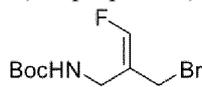
Раствор соединения A3 (438,0 г, 1148,6 ммоль) в безводном тетрагидрофуране (1000 мл) добавляли медленно по каплям в раствор бис(триметилсилил)амида натрия (2M, 1673,0 мл, 3346,0 ммоль) в тетрагидрофуране при -68°C. После этого реакционный раствор перемешивали при -68°C в течение 1 ч и раствор соединения 1-5 (290,0 г, 956,0 ммоль) в тетрагидрофуране (400 мл) медленно добавляли в реакционную смесь и перемешивали в течение еще 8 ч. Реакционный раствор нагревали до 0°C, перемешивали в течение 2 ч и контролировали с помощью ЖХМС. После исчезновения исходных соединений к реакционному раствору добавляли воду (1000 мл) и смесь экстрагировали этилацетатом (500 мл×3). Органические слои объединяли, промывали насыщенным раствором соли (200 мл×2), сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали в вакууме, получая сырой продукт. К неочищенному продукту добавляли 1 кг силикагеля и элюировали петролейным эфиром. Элюированную жидкость упаривали в вакууме с получением остатка. Остаток перегоняли при пониженном давлении (собирали дистилляты при 100-110°C) с получением A4 (светло-желтое масло, 173,0 г, 46,2%, E/Z = 10:1). МС (ESI): m/z=264,15 [M-56+H]⁺.

Пример A5: трет-бутил (E)-(3-фтор-2-(гидроксиметил)аллил)карбамат



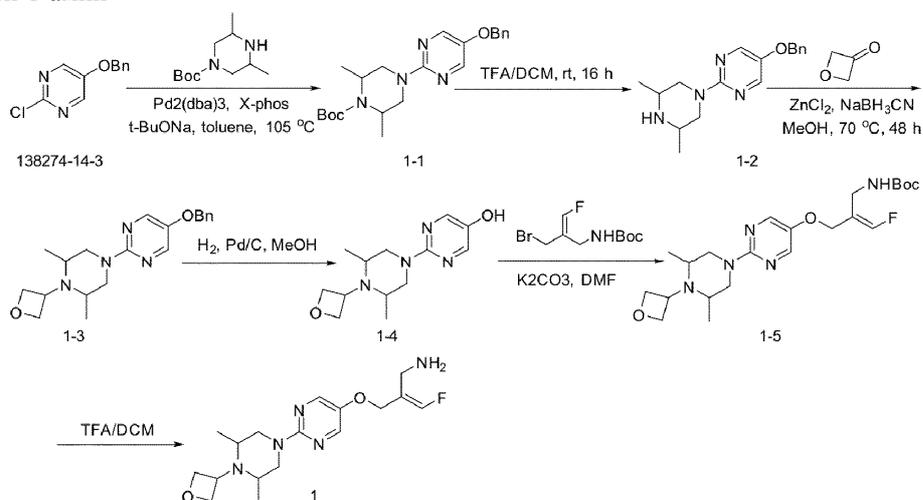
К раствору примера A4 (173,0 г, 538,9 ммоль, E:Z = 10:1) в тетрагидрофуране (400 мл) добавляли тетрагидрат ТВАФ (170,0 г, 538,9 ммоль) при 0°C. Реакционный раствор нагревали до комнатной температуры, перемешивали в течение 1 ч и контролировали с помощью ЖХМС. После исчезновения исходных соединений к реакционной смеси добавляли воду (1000 мл) и смесь экстрагировали этилацетатом (400 мл×2). Органические слои объединяли, промывали 0,1 N водной соляной кислотой (200 мл×2) и насыщенным раствором соли (100 мл×2), сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали в вакууме, получая неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали перегонкой при пониженном давлении (собирали дистилляты при 100-120°C) с получением указанного в заголовке соединения A5 (светло-желтое масло, 104,0 г, 94,2%, E:Z = 10:1). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 6,59 (д, J=83,7 Гц, 1H), 5,01 (уш с, 1H), 3,95 (с, 2H), 3,91 (дд, J=6,5, 1,6 Гц, 2H), 3,81 (уш с, 1H), 1,43 (с, 9H).

Пример А: трет-бутил (E)-2-(бромметил)-3-фтораллилкарбамат

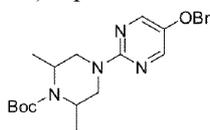


Раствор CuBr_4 (251,9 г, 761,0 ммоль) в безводном 1,2-дихлорметане (100 мл) медленно добавляли по каплям к раствору примера А5 (104,0 г, 507,3 ммоль) и трифенилфосфина (199,4 г, 761,0 ммоль) в безводном 1,2-дихлорметане (580 мл) при 0°C . После добавления по каплям реакционный раствор нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 30 мин. За реакцией следили с помощью ЖХМС. После исчезновения исходных соединений в реакционном растворе реакционный раствор упаривали в вакууме, получая сырой продукт. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией (петролейный эфир:этилацетат = 10:1) с получением указанного в заголовке соединения А (белое твердое вещество 104,0 г, E:Z = 10:1). Его дважды перекристаллизовывали из петролейного эфира (500 мл), получая белое твердое вещество (85,5 г, 63,2%, E:Z = 50:1). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 6,77 (д, $J=81,2$ Гц, 1H), 4,76 (уш с, 1H), 4,00 (д, $J=4,6$ Гц, 2H), 3,95 (дд, $J=3,4, 0,6$ Гц, 2H), 1,45 (с, 9H).

Пример 1. (E)-2-(((2-(3,5-Диметил-4-(оксобутан-3-ил)пиперазин-1-ил)пиримидин-5-ил)оксо)метил)-3-фторпроп-2-ен-1-амин

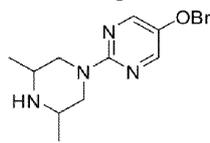


Пример 1-1. трет-Бутил 4-(5-(бензилокси)пиримидин-2-ил)-2,6-диметилпиперазин-1-карбоксилат



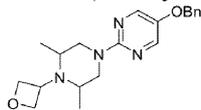
К раствору соединения CAS: 138274-14-3 (220 мг, 1,0 ммоль), трет-бутил-3,5-диметилпиперазин-1-карбоксилата (291 мг, 1,5 ммоль), трет-бутоксид натрия (174 мг, 2,0 ммоль) в толуоле (3 мл) добавляли трис(бензилиденacetон)дипалладий (0) (45 мг, 0,05 ммоль) и 2-дициклогексилфосфор-2,4,6-диизопропилбифенил (47 мг, 0,1 ммоль). Смесь перемешивали при 105°C в атмосфере азота в течение 1 ч в запаянной пробирке. Реакционный раствор охлаждали и концентрировали. Остаток отделяли и очищали с помощью колоночной хроматографии с силикагелем (дихлорметан:метанол = 20:1) с получением указанного в заголовке соединения 1-1 (141 мг, 39%) в виде желтого масла. МС (ESI): $m/z = 399,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Пример 1-2. 5-(Бензилокси)-2-(3,5-диметилпиперазин-1-ил)пиримидин



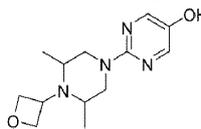
Трифторуксусную кислоту (0,5 мл) добавляли к раствору соединения 1-1 (141 мг, 0,35 ммоль) в дихлорметане (2 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч, концентрировали, доводили до $\text{pH}=9$ с помощью насыщенного раствора бикарбоната натрия. Раствор экстрагировали этилацетатом (20 мл \times 2), сушили и концентрировали с получением указанного в заголовке соединения 1-2 (105 мг, 99%) в виде желтого масла. МС (ESI): $m/z = 299,1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Пример 1-3. 5-(Бензилокси)-2-(3,5-диметил-4-(оксобутан-3-ил)пиперазин-1-ил)пиримидин



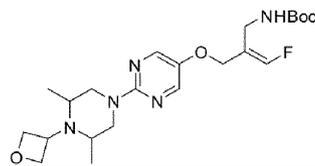
К раствору соединения 1-2 (104 мг, 0,35 ммоль), 3-оксетанона (126 мг, 1,75 ммоль) в метаноле (5 мл) добавляли хлорид цинка в тетрагидрофуране (1 М, 0,52 мл, 0,52 ммоль), цианоборгидрид натрия (66 мг, 1,05 ммоль). Смесь нагревали и перемешивали в течение 48 ч, затем охлаждали и концентрировали. Остаток отделяли и очищали с помощью колоночной хроматографии с силикагелем (петролейный эфир:этилацетат = 13:87) с получением указанного в заголовке соединения 1-3 (44 мг, 35%) в виде желтого твердого вещества. МС (ESI): $m/z = 355,2 [M+H]^+$.

Пример 1-4. 2-(3,5-диметил-4-(оксобутан-3-ил)пиперазин-1-ил)пиримидин-5-фенол



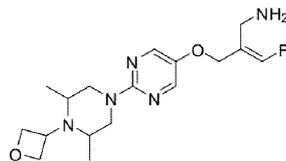
Пример 1-3 (44 мг, 0,12 ммоль) в метаноле (5 мл) помещали в однокорпусную колбу, добавляли палладированный уголь (20 мг) и трижды заменяли водородным баллоном. Реакционный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Палладированный уголь отфильтровывали, и фильтрат концентрировали с получением указанного в заголовке соединения 1-4 (22 мг, 67%) в виде желтого масла. МС (ESI): $m/z = 265,1 [M+H]^+$.

Пример 1-5. трет-Бутил (Е)-2-(((2-(3,5-диметил-4-(оксобутан-3-ил)пиперазин-1-ил)пиримидин-5-ил)оксо)метил)-3-фтораллилкарбамат



К раствору примера 1-4 (22 мг, 0,08 ммоль) и трет-бутил (Е)-2-(бромметил)-3-фтораллилкарбамата (26 мг, 0,1 ммоль) в N,N-диметилформамиде (2 мл) добавляли карбонат калия (17 мг, 0,12 ммоль). Смесь нагревали до 50°C и перемешивали в течение 1 ч, а затем реакционный раствор сразу очищали с помощью колоночной хроматографии с обращенной фазой C-18 (водный раствор ацетонитрила/муравьиной кислоты) с получением указанного в заголовке соединения 1-5 (15 мг, 40%) в виде бесцветного масла. МС (ESI): $m/z = 452,2 [M+H]^+$.

Пример 1. (Е)-2-(((2-(3,5-диметил-4-(оксобутан-3-ил)пиперазин-1-ил)пиримидин-5-ил)оксо)метил)-3-фторпроп-2-ен-1-амин



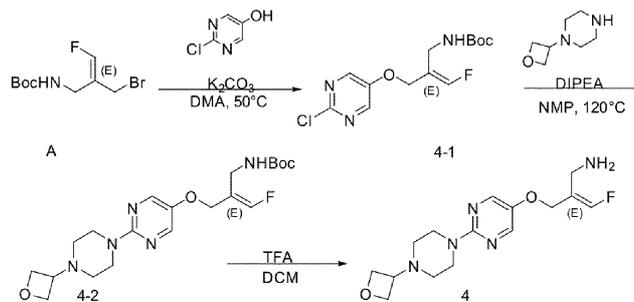
Трифторуксусную кислоту (0,5 мл) добавляли к примеру 1-5 (15 мг, 0,033 ммоль) в дихлорметане (2 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин, концентрировали и доводили до pH 7-8 с помощью аммиачной воды, а затем реакционный раствор сразу очищали с помощью колоночной хроматографии с обращенной фазой C-18 (водный раствор ацетонитрила/бикарбоната аммония) с получением указанного в заголовке соединения 3 (5,5 мг, 47%) в виде белого твердого вещества. МС (ESI): $m/z = 352,6 [M+H]^+$.

^1H ЯМР(400 МГц, CD_3OD): δ 8,15 (с, 2H), 8,20 (д, $J=83,6$ Гц, 1H), 4,73 (т, $J=6,4$ Гц, 2H), 4,54-4,53 (м, 2H), 4,12-4,14 (м, 1H), 3,76-3,72 (м, 2H), 3,57-3,52 (м, 2H), 3,48 (д, $J=2,4$ Гц, 2H), 2,81-2,73 (м, 2H), 1,04 (д, $J=6,4$ Гц, 6H).

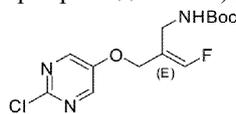
Следующие соединения были получены с использованием способа, аналогичного примеру 1, путем замены соответствующих исходных веществ.

Номер	Структура соединения	ЖХМС, ЯМР
2		МС (ESI): $m/z = 308,9 [M+H]^+$ ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,06 (д, $J = 6,1$ Гц, 2H), 6,63 (д, $J = 82,8$ Гц, 1H), 4,57 (с, 1H), 4,41 (дд, $J = 3,6, 0,8$ Гц, 2H), 3,55 – 3,47 (м, 3H), 3,44 (дд, $J = 10,3, 4,0$ Гц, 1H), 3,30 (с, 3H), 2,96 (д, $J = 10,3$ Гц, 1H), 2,73 (с, 1H), 2,01 (ддд, $J = 13,3, 6,8, 2,5$ Гц, 1H), 1,79 (д, $J = 10,1$ Гц, 1H), 1,66 (с, 1H), 1,55 (с, 1H).
3		МС (ESI): $m/z=308,9 [M+H]^+$. ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 8,12 (с, 2H), 6,99 (с, 0,5H), 6,78 (с, 0,5H), 4,51 (дд, $J = 3,6, 0,9$ Гц, 2H), 4,47 (с, 4H), 3,68 – 3,62 (м, 4H), 3,48 (д, $J = 2,1$ Гц, 2H), 1,88 – 1,82 (м, 4H).

Пример 4. (E)-3-Фтор-2-(((2-(4-(оксобутан-3-ил)пиперазин-1-ил)пиримидин-5-ил)оксо)метил)проп-2-ен-1-амин

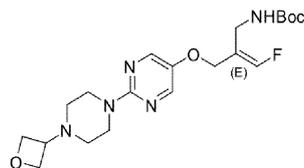


Пример 4-1. трет-Бутил (E)-2-(((2-(2-хлорпиримидин-5-ил)оксо)метил)-3-фтораллил)карбамат



К раствору 2-хлорпиримидин-5-фенола (5725 мг, 44,0 ммоль), K_2CO_3 (7600 мг, 55,0 ммоль) в *N,N*-диметилацетамиде (80 мл) добавляли соединение А (9800 мг, 36,7 ммоль). Смесь подвергали реакции при 50°C в течение 3 ч. После завершения реакции реакционный раствор охлаждали до комнатной температуры и добавляли медленно по каплям к воде (800 мл). Твердое вещество медленно выпадало в осадок. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, пока твердое вещество не стало однородным. Твердое вещество фильтровали, промывали водой и сушили. Добавляли 200 мл растворителя (петролейный эфир:этилацетат = 10:1) и перемешивали в течение 6 ч. Твердое вещество фильтровали и сушили с получением указанного в заголовке соединения 4-1 (9600 мг, 82,5%) в виде беловатого твердого вещества. МС (ESI): $m/z = 262,0 [M-55]^+$.

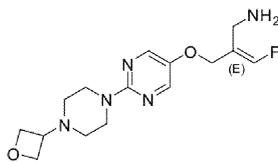
Пример 4-2. трет-Бутил (E)-3-фтор-2-(((2-(4-(оксобутан-3-ил)пиперазин-1-ил)пиримидин-5-ил)оксо)метил)аллил)карбамат



К раствору примера 4-1 (9600 мг, 30,2 ммоль) в *N*-метилпирролидоне (80 мл) добавляли 1-(оксобутанцикло-3-ил)пиперазин (10750 мг, 75,7 ммоль) и *N,N*-диизопропилэтиламин (7813 мг, 60,5 ммоль). Полученную смесь нагревали в течение ночи при 120°C в запаянной пробирке. После завершения реакции добавляли воду (500 мл). Смесь трижды экстрагировали этилацетатом (100 мл). Объединенные органические фазы трижды промывали водой (80 мл) и один раз насыщенным раствором соли (80 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали. Добавляли 80 мл растворителя (петролейный эфир: этилацетат = 10: 1) и перемешивали в течение 6 ч. Твердое вещество фильтровали и су-

шили с получением указанного в заголовке соединения 4-2 (10200 мг, 79,6%) в виде беловатого твердого вещества. МС (ESI): $m/z = 424,2 [M+H]^+$.

Пример 4. (E)-3-Фтор-2-(((2-(4-(оксобутан-3-ил)пиперазин-1-ил)пиримидин-5-ил)оксо)метил)проп-2-ен-1-амин

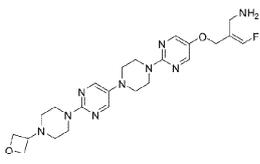
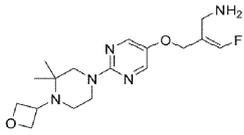
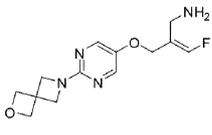
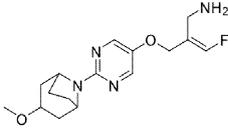


При 0°C к раствору примера 4-2 (8460 мг, 20 ммоль) в дихлорметане (60 мл) добавляли трифторуксусную кислоту (30 мл). Раствор перемешивали при 0°C в течение 3 ч. После завершения реакции раствор концентрировали, а затем добавляли воду (10 мл). По каплям добавляли аммиак для доведения pH до 9. После очистки с помощью колоночной хроматографии с обращенной фазой (подвижная фаза: водный раствор ацетонитрил/бикарбонат аммония) указанное в заголовке соединение (6000 мг, 92,8%) получили в виде белого твердого вещества. МС (ESI): $m/z = 324,0 [M+H]^+$.

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ 8,15 (с, 2H), 6,94 (с, 0,5H), 6,73 (с, 0,5H), 4,69 (т, J=6,7 Гц, 2H), 4,62 (т, J=6,2 Гц, 2H), 4,52 (дд, J=3,6, 0,8 Гц, 2H), 3,73 (т, J=3,9 Гц, 4H), 3,53 - 3,45 (м, 1H), 3,43 (д, J=2,4 Гц, 2H), 2,38 (т, J=3,9 Гц, 4H).

Следующие соединения были получены с использованием способа, аналогичного способам в примерах 1 и 4, путем замены соответствующих исходных соединений.

Номер	Структура соединения	ЖХМС, ЯМР
5		МС (ESI): $m/z = 352,1 [M+H]^+$. ¹ H ЯМР (400 МГц, CD ₃ OD) δ 8,21 (с, 2H), 8,20 (д, J = 82,8 Гц, 1H), 4,71 (т, J = 6,8 Гц, 2H), 4,61 (д, J = 6,0 Гц, 2H), 4,58-4,57 (м, 2H), 3,73 (д, J = 6,8 Гц, 2H), 3,51 (д, J = 2,0 Гц, 2H), 3,47-3,41 (м, 1H), 2,44 (д, J = 6,8 Гц, 2H), 2,17 (с, 2H), 1,51 (с, 6H).
6		МС (ESI): $m/z = 350,6 [M+H]^+$. ¹ H ЯМР (400 МГц, CD ₃ OD) δ 8,15 (с, 2H), 6,87 (д, J = 83,2 Гц, 1H), 4,75 (т, J = 2,0 Гц, 2H), 4,58 (т, J = 2,0 Гц, 2H), 4,56-4,53 (м, 2H), 4,15-4,11 (м, 2H), 3,79-3,73 (м, 1H), 3,46-3,45 (м, 2H), 3,26-3,21 (м, 2H), 3,12-3,09 (м, 2H), 1,93-1,87 (м, 2H), 1,66-1,58 (м, 2H).
7		МС (ESI): $m/z = 348,6 [M+H]^+$. ¹ H ЯМР (400 МГц, CD ₃ OD) δ 8,20 (д, J = 3,2 Гц, 1H), 7,70 (д, J = 2,8 Гц, 1H), 8,20 (д, J = 82,8 Гц, 1H), 4,72 (т, J = 6,8 Гц, 2H), 4,64 (д, J = 6,0 Гц, 2H), 4,59-4,52 (м, 2H), 3,60-3,57 (м, 1H), 3,53-3,50 (м, 6H), 2,52 (д, J = 4,2 Гц, 4H).
8		МС (ESI): $m/z = 323,9 [M+H]^+$. ¹ H ЯМР (400 МГц, CD ₃ OD) δ 8,50 - 8,39 (м, 1H), 8,15 (с, 2H), 7,01 (д, J=81,2 Гц, 1H), 4,73 (д, J = 2,4 Гц, 2H), 4,65 (с, 2H), 4,58 (с, 2H), 3,74 - 3,66 (м, 4H), 3,59 (д, J = 2,4 Гц, 2H), 3,49 - 3,40 (м, 1H), 2,37 - 2,30 (м, 4H).

9		<p>МС (ESI): $m/z = 486,2 [M+H]^+$.</p> <p>^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 8,24 (с, 2H), 8,18 (с, 2H), 7,13 (д, $J = 80,5$ Гц, 1H), 4,83 – 4,76 (м, 4H), 4,56 – 4,52 (м, 2H), 4,37 (тд, $J = 7,0, 3,6$ Гц, 1H), 3,87 – 3,81 (м, 4H), 3,75 (с, 2H), 3,13 – 3,08 (м, 4H).</p>
10		<p>МС (ESI): $m/z = 352,6 [M+H]^+$.</p> <p>^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 8,17 (с, 2H), 7,15 (д, $J = 81,2$ Гц, 1H), 4,82-4,78 (м, 2H), 4,65-4,62 (м, 2H), 4,58-4,56 (м, 2H), 4,46-4,38 (м, 1H), 3,86-3,83 (м, 2H), 3,79 (д, $J = 2,0$ Гц, 2H), 3,61 (с, 2H), 2,86-2,84 (м, 2H), 1,35-1,08 (м, 6H).</p>
11		<p>МС (ESI): $m/z = 280,9 [M+H]^+$.</p> <p>^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,10 (с, 2H), 6,68 (д, $J = 81,9$ Гц, 1H), 4,83 (с, 4H), 4,45 (с, 2H), 4,21 (д, $J = 6,7$ Гц, 4H), 3,57 (с, 2H).</p>
12		<p>МС (ESI): $m/z = 322,9 [M+H]^+$.</p> <p>^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 8,43 (с, 2H), 7,26 (д, $J = 80,6$ Гц, 1H), 4,77 – 4,67 (м, 4H), 3,84 (с, 2H), 3,52 (с, 1H), 3,33 (с, 3H), 2,36 – 2,26 (м, 2H), 2,15 – 2,00 (м, 6H).</p>

Пример биологического исследования 1: Анализ ингибирующей активности соединений в отношении SSAO/VAP-1 *in vitro*

Этот анализ использовали для оценки ингибирующей активности соединений *in vitro* в отношении SSAO/VAP-1 различных видов. Использовали рекомбинантный белок SSAO человека, белок SSAO мыши или белок SSAO крысы (предоставленный Eli Lilly). Набор для определения активности ферментов, набор для анализа MAO-Glo (V1402) был приобретен у Promega. Готовили буфер для ферментной реакции (50 мМ HEPES, 120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl_2 , 1,4 мМ MgCl_2 , 0,001% Tween-20, pH 7,4). Исследуемое соединение растворяли в ДМСО и разбавляли в градиенте 3-кратно концентрации. Конечная концентрация исследуемого соединения в реакционной системе объемом 10 мкл составляла от 1 мкМ до 0,05 нМ при обнаружении SSAO. Содержание ДМСО в обнаруженной реакции составляло 1%. После того, как раствор исследуемого соединения в ДМСО был разбавлен буфером для ферментной реакции в объемном соотношении 1:25, 2,5 мкл которого было добавлено в каждую лунку планшета для обнаружения, по два повтора для каждой концентрации. В каждую лунку добавляли 5 мкл белка SSAO, разведенного в буфере для ферментной реакции, конечная концентрация которого составляла от 10 нМ до 80 нМ в 10 мкл реакционной системы. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. В каждую лунку добавляли 2,5 мкл реакционного субстрата, разведенного в буфере для ферментативной реакции, конечная концентрация которого составляла 10 мкМ в 10 мкл реакционной системы. После того как смесь прореагировала при комнатной температуре в течение 120 мин, в каждую лунку добавляли 10 мкл детектирующего реагента. Реакционный раствор инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре и планшет считывали с помощью Synergy Neo 2 для обнаружения. Значение было преобразовано в степень ингибирования по следующей формуле:

$$\text{Степень ингибирования} = (\text{Сигнал}_{\text{полож.}} - \text{Сигнал}_{\text{исслед.}}) / (\text{Сигнал}_{\text{полож.}} - \text{Сигнал}_{\text{отриц.}}) \times 100\%$$

$\text{Сигнал}_{\text{полож.}}$ представлял собой положительный контроль без исследуемого соединения. $\text{Сигнал}_{\text{отриц.}}$ представлял собой отрицательный контроль без исследуемого соединения и фермента SSAO, а $\text{Сигнал}_{\text{исслед.}}$ представлял собой значение обнаружения каждого соединения в различных концентрациях. Значение IC_{50} рассчитывали с использованием приближения кривой по 4 параметрам. Для соединений со степенью

ингибирования менее 50% в пределах исследуемого диапазона соединения значение IC_{50} было больше, чем самая высокая исследуемая концентрация.

После исследования соединения в примерах настоящего изобретения могут эффективно ингибировать активность фермента SSAO/VAP-1 различных видов, и результаты показаны в табл. 1.

Пример биологического исследования 2: Анализ ингибирующей активности соединений в отношении MAO-A и MAO-B

Рекомбинантный белок MAO-A и MAO-B человека был приобретен у Sigma (M7316, M7441). Другие реагенты такие же, как в примере биологического исследования 1. Конечная концентрация исследуемого соединения в 10 мкл реакционной системы составляла от 100 мкМ до 5 нМ, когда были обнаружены MAO-A и MAO-B. Конечные концентрации белка MAO-A и MAO-B в 10 мкл реакционной системы составляли 70 нМ и 300 нМ, соответственно, тогда как другие условия реакции были такими же, как и в примере биологического исследования 1. Анализ данных и способ расчета IC_{50} были такими же, как в примере биологического исследования 1. Для соединений со степенью ингибирования менее 50% в пределах исследуемого диапазона соединения значение IC_{50} было больше, чем самая высокая исследуемая концентрация. Результаты представлены в табл. 1.

Пример биологического исследования 3: Анализ ингибирующей активности соединений в отношении AOC1

Рекомбинантный белок AOC1/DAO человека был приобретен в R&D systems (Cat: 8298-AO). Amplex UltraRed был приобретен у Thermo Scientific (Cat: A36006). HRP (Cat: P8250) и путресцин (Cat: V900377) были приобретены у Sigma. Готовили буфер для ферментной реакции (50 мМ HEPES, 120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 1,4 мМ MgCl₂, 0,001% Tween-20, pH 7,4). Исследуемое соединение растворяли в ДМСО и разбавляли в градиенте 3-кратно концентрации. Конечная концентрация исследуемого соединения в 10 мкл реакционной системы составляла от 100 мкМ до 5 нМ при обнаружении AOC1. Содержание ДМСО в обнаруженной реакции составляло 1%. После того, как раствор исследуемого соединения в ДМСО был разбавлен в буфере для ферментной реакции в объемном соотношении 1:25, 10 мкл смеси добавляли в каждую лунку планшета для обнаружения. 4× смесь субстратов (содержащая 400 мкМ путресцина, 4 ед./мл HRP, 4 мкМ Amplex UltraRed) готовили в буфере для ферментной реакции, 10 мкл которого добавляли в каждую лунку. 20 мкл белка AOC1, разведенного в буфере для ферментной реакции, добавляли в каждую лунку до конечной концентрации 0,4 нМ в 40 мкл реакционной системы. Synergy Neo 2 использовали для считывания планшета на предмет обнаружения. Прибор устанавливали на 30°C, длину волны возбуждения 530 нм, длину волны излучения 590 нм. Обнаружение производилось один раз в минуту в течение 30 мин непрерывно. Активность фермента рассчитывалась на основании увеличения сигнала каждой лунки с 10-й до 30-й минуты. Значение было преобразовано в степень ингибирования по следующей формуле:

$$\text{Степень ингибирования} = (\text{Сигнал}_{\text{полож.}} - \text{Сигнал}_{\text{исслед.}}) / (\text{Сигнал}_{\text{полож.}} - \text{Сигнал}_{\text{отриц.}}) \times 100\%$$

$\text{Сигнал}_{\text{полож.}}$ представлял собой положительный контроль без исследуемого соединения. $\text{Сигнал}_{\text{отриц.}}$ представлял собой отрицательный контроль без исследуемого соединения и AOC1, а $\text{Сигнал}_{\text{исслед.}}$ представлял собой значение обнаружения разных соединений при каждой концентрации. Значение IC_{50} рассчитывали с использованием приближения кривой по 4 параметрам. Для соединений со степенью ингибирования менее 50% в пределах исследуемого диапазона соединения значение IC_{50} было больше, чем самая высокая исследуемая концентрация.

Результаты показаны в табл. 1.

Пример биологического исследования 4: Анализ ингибирующей активности соединений в отношении AOC2.

Рекомбинантный белок AOC2 человека (предоставлен Eli Lilly). Другие реагенты такие же, как и в примере биологического исследования 1. Конечная концентрация исследуемого соединения в 10 мкл реакционной системы составляла от 100 мкМ до 5 нМ при обнаружении AOC2, тогда как другие условия реакции были такими же, как в примере биологического исследования 1. Анализ данных и способ расчета IC_{50} были такими же, как и в примере биологического исследования 1. Для соединений со степенью ингибирования менее 50% в пределах исследуемого диапазона соединения значение IC_{50} было больше, чем самая высокая исследуемая концентрация.

Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Ингибирующая активность IC₅₀ (нМ) соединений in vitro против SSAO различных видов и других аминоксидаз

Пример	SSAO человека	AOC1	AOC2	MAO-A	MAO-B	SSAO крысы	SSAO мыши
1	A	E	F	I	K	NA	NA
2	A	D	G	H	K	L	L
3	A	D	G	H	K	NA	NA
4	A	E	G	I	K	L	L
5	B	E	F	I	K	NA	NA
6	B	E	F	I	K	NA	NA
7	C	E	G	I	J	NA	NA
8	A	E	G	H	J	NA	NA
9	A	D	F	I	K	NA	NA
10	B	E	G	I	K	NA	NA
11	C	NA	NA	H	K	NA	NA
12	A	E	G	H	K	L	L

Фермент	Буква	Ингибирующая активность IC ₅₀ (нМ)
SSAO человека	A	<10
	B	10~50
	C	>50
AOC1	D	100~10000
	E	>10000
AOC2	F	100~1000
	G	>1000
MAO-A	H	2000~100000
	I	>100000
MAO-B	J	5000~20000
	K	>20000
SSAO крысы	L	<100
SSAO мыши	L	<100

Приведенные выше результаты показывают, что соединения по настоящему изобретению проявляют превосходную ингибирующую активность против AOC3 и довольно хорошую селективность в отношении подтипов аминоксидазы.

Пример биологического исследования 5: Анализ ингибирующей активности соединений в отношении SSAO/VAP-1 на модели мышь/крыса

Набор для анализа MAO-Glo (Promega, V1402) использовали для определения активности SSAO в тканях животных. После того, как исследуемые соединения были введены животному, была рассчитана активность фермента SSAO путем измерения активности моноаминоксидаз в гомогенате ткани животного, который был нечувствителен к ингибиторам MAO клогилину и паргилину. Соединения вводили крысам перорально в различных дозах и контрольным животным перорально вводили тот же объем носителя. Плазма, головной мозг, сетчатка, тонкий кишечник, легкие, печень и почки животных были собраны соответственно через 24 ч после введения (животных перфузировали PBS перед забором тонкой кишки, легких, печени и почек) и хранили в -80°C в холодильнике до анализа. Каждую ткань гомогенизировали в буфере для лизиса гомогената ткани (20 мМ HEPES, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ EGTA, 1% Тритон X-100 и 1 таблетка ингибитора протеазы Roche Complete). Гомогенат центрифугировали при 12000 об/мин при 4°C в течение 30 мин для удаления фрагментов ткани. 5 мкл надосадочной жидкости и

2 мкл смеси клогилина (10 мкМ) и паргилина (10 мкМ) инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем к смеси добавляли 2 мкл субстрата из набора для анализа MAO-Glo, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 60 мин. Реагенты для обнаружения добавляли для гашения реакции в соответствии с инструкциями. Данные о флуоресценции считывались с помощью Biotek Neo2. Активность моноаминоксидазы в тканях, которые не чувствительны к ингибиторам MAO, использовали для представления активности SSAO. Процент активности SSAO у животных, которым вводили соединения, сравнивали с таковым у контрольных животных для расчета степени ингибирования соединения.

Результаты испытаний показывают, что соединения могут эффективно ингибировать активность SSAO в различных тканях животных после введения. Результаты представлены в табл. 2 и 3.

Таблица 2. Оставшийся процент активности SSAO (% активности SSAO) через 24 ч после однократного введения соединения

Пример	Доза (мг/кг)	Плазма	Головной мозг	Сетчатка
2	0,6	24,3±5,2	49,1±21,2	28,7±8,5
3	1	15,2±2,6	55,6±10,5	8,9±3,2
10	0,6	5,8±2,1	27,3±1,8	8±0,8
12	1	25,6±3	63,1±12,1	24,6±3,5

Данные в таблице представлены как среднее ± SEM, N = 3.

Таблица 3. Оставшийся процент активности SSAO (% активности SSAO) соединения примера 4 через 24 ч после однократного введения

Доза (мг/кг)	Плазма	Головной мозг	Сетчатка	Печень	Легкие	Почки	Тонкий кишечник
15	1,1±0,4	4±1,7	3±2,2	-2,4±5,4	2,2±0,2	2,4±1,3	1,1±0,9
3	1,8±0,2	22,1±7,7	5,2±2,4	5,3±3,2	4,6±2,5	0,7±1,8	11,1±4,4
0,6	12,9±2,2	26,5±11,8	8±1,2	3±7,6	14,1±3,8	26,2±10,1	38,9±3,2
0,12	33,7±1,9	75,4±7,4	25,1±5,3	40,1±8,2	39,8±11,3	46,3±3,5	96,9±21,7
0,025	58,6±4,2	143,1±68,3	49,1±7,1	14,4±8,1	64±20,3	58,7±12,1	/
0,005	61,7±8,2	98,3±25,4	65±14	107,7±33,5	94,9±17,2	99,2±4,1	/
Контроль	99,89±8,8	100±18,7	100±23	99,89±14,4	100±36	99,89±5,7	100±3,2

Данные в таблице представлены как среднее ± SEM, N = 3.

Пример биологического исследования 6: Фармакодинамическое исследование соединения SSAO на модели заболевания, связанного с глазным воспалением

22 крысы (7-8 недель, 220-250 г) были разделены на 3 группы: контрольная группа (6), модельная группа (8) и группа, обработанная соединением (8). Для модельной группы и группы, обработанной соединением, глазное воспаление вызывали однократной инъекцией 8 мкг/100 мкл липополисахарида (Sigma-Aldrich-L2880) в подушечку лапы. Крысы были разделены на группы в соответствии с их массой тела за 1 час до индукции. Соединение примера 4 (6 мг/кг, 10 мл/кг) или носитель (10 мл/кг) вводили перорально соответственно. Через 24 ч после индукции собирали переднюю внутриглазную жидкость и удаляли глазные яблоки для рассечения сетчатки. Глазное воспаление количественно оценивали путем измерения концентрации белка и количества клеток в внутриглазной жидкости. Метод кПЦР использовался для проверки изменений в экспрессии генов, связанных с воспалением сетчатки глаза.

Методы определения количества клеток и концентрации белка в внутриглазной жидкости

10 мкл внутриглазной жидкости разводили в 40 мкл PBS и перемешивали, затем 25 мкл смеси смешивали с 75 мкл PBS и центрифугировали при 300 об/мин в течение 5 мин при 4°C. 55 мкл надосадочной жидкости осторожно аспирировали и концентрацию белка определяли в соответствии с методом, описанным в наборе для анализа белков BCA (Pierce-23227); после ресуспендирования оставшегося образца, 40 мкл клеточной суспензии добавляли в 100 мкл 1% FBS/PBS для анализа и подсчета живых клеток с использованием проточной цитометрии NovoCyte 3130 после исключения клеточного дебриса.

По сравнению с контрольной группой концентрация общего белка в внутриглазной жидкости в мо-

дельной группе значительно увеличилась (среднее \pm SEM: 9730,04 \pm 1232,30 мкг/мл против 3147,42 \pm 404,79 мкг/мл), и количество клеток значительно увеличилось (среднее \pm SEM: 48,28 \pm 21,46*10⁴ клеток/мл против 2,69 \pm 0,45*10⁴ клеток/мл), что позволяет предположить, что модель глазного воспалительного заболевания была успешно индуцирована.

По сравнению с модельной группой, концентрация белка была снижена (среднее \pm SEM: 7275,44 \pm 622,66 против 9730,04 \pm 1232,30 мкг/мл), и количество клеток значительно уменьшилось в группе, обработанной соединением (среднее \pm SEM: 5,07 \pm 0,80*10⁴ клеток/мл против 48,28 \pm 21,46*10⁴ клеток/мл), предполагая, что соединение примера 4 может значительно облегчить симптомы заболевания, связанного с глазным воспалением. Как показано на фиг. 1, соединение примера 4 может значительно облегчить симптомы, связанные с воспалением глаз, на модели индуцированного LPS воспалительного заболевания у крыс; фиг. 1А. Изменения концентрации белка в внутриглазной жидкости (мкг/мл); Рисунок 1В. Изменения количества клеток в внутриглазной жидкости (*10⁴/мл).

Определение уровня экспрессии генов, связанных с воспалением в сетчатке: 1) Были синтезированы праймеры со следующей информацией:

Название праймера	Последовательность (5'to3')
Rat-Alox5ap-F	CCTTCGCTGGGCTGATGTAT
Rat-Alox5ap-R	ATAGGATGATCCGCTTGCCG
Rat-Socs3-F	CCCCGCTTTGACTGTGTACT
Rat-Socs3-R	AAAGGAAGGTTCCGTCGGTG
Rat-UBC-F	ACACCAAGAAGGTCAAACAGG
Rat-UBC-R	AGACACCTCCCATCAAACC
Rat-TLR7-F	AGCTCTGTTCCTCCACCA
Rat-TLR7-R	ACCATCGAAACCCAAGGACTC

2) РНК сетчатки экстрагировали в соответствии с инструкциями по использованию набора для экстракции РНК (RNeasy Mini Kit, Qiagen-74104), а затем РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК (наборы для обратной транскрипции кДНК высокой емкости, ABI-4374966). Полученную кДНК разбавляли в 10 раз, чтобы она служила шаблоном реакции кПЦР. Согласно инструкциям набора Power SYBR Green (ABI-A25918), реакцию кПЦР проводили на оборудовании CFX384 Real-Time qPCR. Количественный анализ изменений экспрессии для каждой экспрессии гена проводили с использованием программного обеспечения CFX Maestro методом $\Delta\Delta Ct$ с UBC в качестве внутреннего домашнего гена.

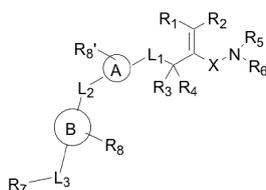
По сравнению с контрольной группой уровень экспрессии генов ALOX5AP, SOCS3 и TLR7 значительно увеличился в модельной группе. По сравнению с модельной группой, уровни экспрессии генов ALOX5AP, SOCS3 и TLR7 значительно снизились в группе, обработанной соединением, как показано на фиг. 2. После анализа вся экспрессия генов ALOX5AP, SOCS3 и TLR7 регулировалась сигнальным путем NFkB, который был очень важным молекулярным сигнальным путем при воспалительных заболеваниях.

Фиг. 2: Соединение примера 4 может значительно снизить уровень экспрессии генов, связанных с воспалением, в сетчатке на модели крыс с индуцированным LPS воспалительным заболеванием. А. ALOX5AP; В. SOCS3; С. TLR7.

Вся литература, упомянутая в настоящей заявке, включена сюда посредством ссылки, как если бы каждая из них отдельно включалась посредством ссылки. Кроме того, следует понимать, что после прочтения приведенных выше методов специалисты в данной области техники могут внести различные изменения и модификации в настоящее изобретение. Эти эквиваленты также входят в объем, определенный прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение в соответствии с формулой I или его стереоизомеры или рацематы, или его фармацевтически приемлемые соли



где

А отсутствует;

В представляет собой замещенное или незамещенное 6-членное гетероароматическое кольцо, со-

держашее 1-2 гетероатома азота;

L_1 представляет собой -O-;

L_2 отсутствует;

R_1, R_2 каждый независимо выбран из группы, состоящей из H и F;

R_3, R_4 каждый представляет собой H;

R_5, R_6 каждый представляет собой H;

R_7 представляет собой 4-6-членное гетероциклическое кольцо, содержащее 1 атом кислорода;

L_3 представляет собой замещенное или незамещенное 6-10-членное гетероциклическое кольцо, содержащее 2 гетероатома азота;

R_8 выбран из группы, состоящей из H и -CN;

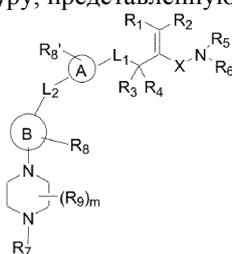
X представляет собой $-CR_{11}R_{12}$;

R_{11}, R_{12} каждый представляет собой H;

при условии, что указанные выше группы составляют химически стабильную структуру;

если не указано иное, вышеупомянутый "замещенный" означает, что один или несколько атомов водорода в группе замещаются заместителем C_1-C_6 -алкилом.

2. Соединение по п.1, или его стереоизомеры или рацематы, или его фармацевтически приемлемые соли, соединение формулы I имеет структуру, представленную следующей формулой:



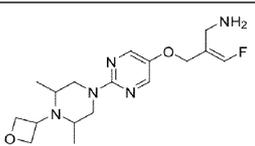
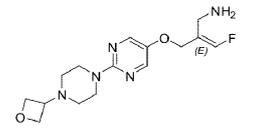
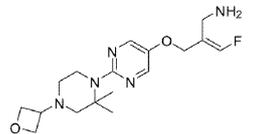
где m равно 0, 1, 2, 3 или 4;

R_9 представляет собой C_1-C_6 -алкил.

3. Соединение по п.1, или его стереоизомеры или рацематы, или его фармацевтически приемлемые

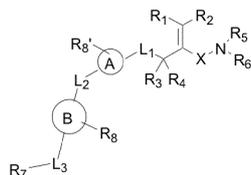
соли, в котором R_7 представляет собой , где каждый из p и q независимо выбран из группы, состоящей из 0, 1 или 2, а сумма p и q ≥ 2 .

4. Соединение по любому из пп.1-3, в котором соединение выбрано из следующей группы:

Номер соединения	Структура соединения
1	
4	
5	

6	
7	
8	
10	

5. Соединение в соответствии с Формулой I или его стереоизомеры или рацематы, или его фармацевтически приемлемые соли



где

A отсутствует;

B представляет собой замещенное или незамещенное 6-членное гетероароматическое кольцо, содержащее 1-2 гетероатома азота;

L₁ представляет собой -O-;

L₂ отсутствует;

R₁, R₂ каждый независимо выбран из группы, состоящей из H и F;

R₃, R₄ каждый представляет собой H;

R₅, R₆ каждый представляет собой H;

R₇ выбран из группы, состоящей из H и C₁-C₆-алкоксила;

L₃ выбран из группы, состоящей из замещенного или незамещенного 6-10-членного мостикового гетероциклического кольца, содержащего 1-2 гетероатома азота, и 6-10-членного спирогетероциклического кольца, содержащего 2 гетероатома азота и кислорода;

R₈ выбран из группы, состоящей из H и -CN;

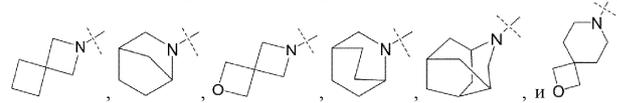
X представляет собой -CR₁₁R₁₂;

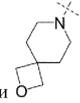
R₁₁, R₁₂ каждый представляет собой H;

при условии, что указанные выше группы составляют химически стабильную структуру;

если не указано иное, вышеупомянутый "замещенный" означает, что один или несколько атомов водорода в группе замещаются заместителем C₁-C₆-алкилом.

6. Соединение по п.5, или его стереоизомеры или рацематы, или его фармацевтически приемлемые соли, в котором L₃ представляет собой структуру, выбранную из группы, состоящей из

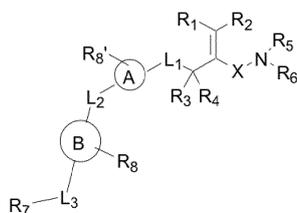


и  в то время как L₃ может быть замещенным или незамещенным.

7. Соединение по любому из пп.5, 6, в котором соединение выбрано из следующей группы:

Номер соединения	Структура соединения
2	
3	
11	
12	

8. Соединение в соответствии с формулой I или его стереоизомеры или рацематы, или его фармацевтически приемлемые соли



где

A представляет собой замещенное или незамещенное 6-членное гетероароматическое кольцо, содержащее 1-2 гетероатома азота;

B представляет собой замещенный или незамещенный пиримидинил, или замещенный или незамещенный пиридинил;

L₁ представляет собой -O-;

L₂ представляет собой замещенное или незамещенное 6-10-членное гетероциклическое кольцо, содержащее 2 гетероатома азота;

L₃ представляет собой замещенное или незамещенное пиперазиновое кольцо;

R₁, R₂ каждый независимо выбран из группы, состоящей из H и F;

R₃, R₄ каждый представляет собой H;

R₅, R₆ каждый представляет собой H;

R₇ представляет собой 4-6-членное гетероциклическое кольцо, содержащее 1 атом кислорода;

R₈ представляет собой H;

R₈' представляет собой H или -CN;

X представляет собой -CR₁₁R₁₂;

R₁₁, R₁₂ каждый представляет собой H;

при условии, что указанные выше группы составляют химически стабильную структуру;

если не указано иное, вышеупомянутый "замещенный" означает, что один или несколько атомов водорода в группе замещаются заместителем C₁-C₆-алкилом.

9. Соединение по п.8, где соединение представляет собой

Номер соединения	Структура соединения
9	

10. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество соединения по любому из пп.1-9 или его стереоизомеров или рацематов, или его фармацевтически приемлемых солей и фармацевтически приемлемый наполнитель; где фармацевтическая композиция используется для предотвращения и/или лечения заболеваний, связанных с семикарбазид-чувствительной аминоксидазой (SSAO) или регулируемых белком семикарбазид-чувствительной аминоксидазы/белком сосудистой адгезии-1 (SSAO/VAP-1).

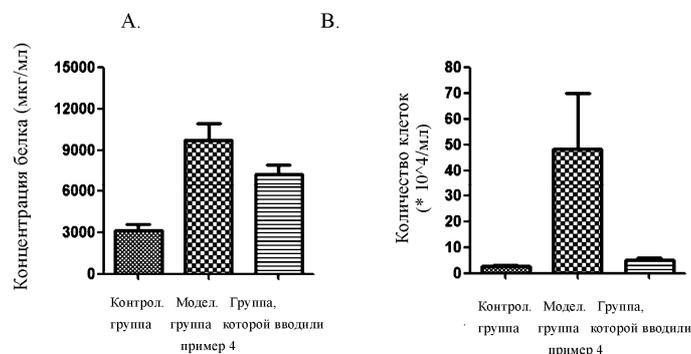
11. Применение соединения по любому из пп.1-9 для приготовления фармацевтической композиции, где фармацевтическая композиция предназначена для лечения заболеваний, выбранных из группы, состоящей из воспалительных заболеваний и/или заболеваний, связанных с воспалением, диабета и/или заболеваний, связанных с диабетом, психических расстройств, ишемических заболеваний, сосудистых заболеваний, глазных заболеваний, фиброза, нейровоспалительных заболеваний, заболеваний, связанных с болью, рака или отторжения тканевого трансплантата.

12. Применение по п.11, отличающееся тем, что воспалительные заболевания и/или заболевания, связанные с воспалением, выбраны из группы, состоящей из артрита и боли, вызванной артритом, болезни Крона, язвенного колита, воспалительного заболевания кишечника, псориаза, астмы, пневмонии, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), бронхоэктаза, воспаления кожи, заболевания глаз, контактного дерматита, гепатита, аутоиммунного заболевания печени, аутоиммунного гепатита, первичного билиарного цирроза, склерозирующего холангита, аутоиммунного холангита, алкогольного холангита, атеросклероза, хронической сердечной недостаточности, застойной сердечной недостаточности, ишемической болезни, инсульта и его осложнений, инфаркта миокарда и его осложнений, разрушения воспалительных клеток после инсульта, синовита и системного воспалительного сепсиса.

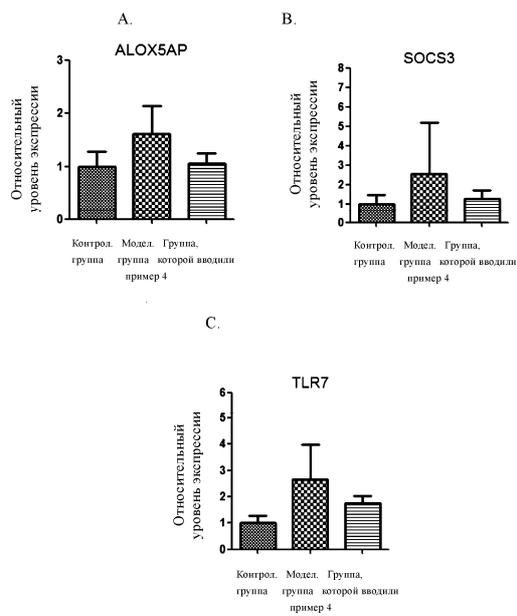
13. Применение по п.11, отличающееся тем, что диабет и/или заболевания, связанные с диабетом, представляют собой диабет I типа, диабет II типа, синдром X, диабетическую ретинопатию, диабетическую нефропатию, диабетическую невропатию или диабетический отек желтого пятна.

14. Применение по п.12, отличающееся тем, что глазные заболевания представляют собой увеит или дегенерацию желтого пятна.

15. Применение по п.11, отличающееся тем, что фиброз выбран из группы, состоящей из муковисцидоза, идиопатического фиброза легких, фиброза печени, включая неалкогольную жировую болезнь печени, такую как неалкогольный стеатогепатит (NASH), и вызванного алкоголем фиброза, вызывающего цирроз печени, почечного фиброза, склеродермии, радиационно-индуцированного фиброза и осложнений, вызванных фиброзом.



Фиг. 1



Фиг. 2

