

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 047003

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.05.27

(51) Int. Cl. C07D 217/14 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61K 31/472 (2006.01)

(21) Номер заявки
202192414

(22) Дата подачи заявки
2020.05.08

(54) СОЕДИНЕНИЯ-ИНГИБИТОРЫ НАТРИЙ-ВОДОРОДНОГО ОБМЕННИКА 3

(31) 62/848,652

(56) WO-A2-2014169094
WO-A1-2018034883

(32) 2019.05.16

(33) US

(43) 2022.03.02

(86) PCT/US2020/031999

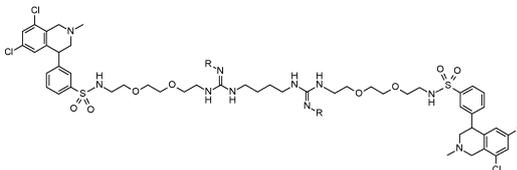
(87) WO 2020/231770 2020.11.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
Гавардинас Костас, Джадхав
Прабхакар, Ван Сяоцзюнь, Веттерау
Джон Роули (US)

(74) Представитель:
Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Гизатуллина Е.М.,
Костюшенкова М.Ю., Строкова О.В.,
Парамонова К.В. (RU)

(57) Изобретение относится к соединениям-ингибиторам натрий-водородного обменника 3 (NHE3) формулы:



к фармацевтическим композициям, содержащим указанное соединение, и к применению указанного соединения для лечения определенных заболеваний, связанных с повышенными уровнями натрия и/или фосфата.

B1

047003

047003

B1

Настоящее изобретение относится к новым соединениям-ингибиторам натрий-водородного обменника 3 (NHE3), к фармацевтическим композициям, содержащим эти соединения, и к применению соединений для лечения некоторых заболеваний, связанных с повышенными уровнями натрия и/или фосфата. Настоящее изобретение также относится к применению новых соединений NHE3 в комбинации с некоторыми ингибиторами натрийзависимого фосфатного котранспортера (NPT2b).

NHE3 представляет собой эпителиальный натрий-водородный обменник, присутствующий в тонкой кишке, толстой кишке, желчном пузыре, проксимальных почечных канальцах, а также в толстой и тонкой частях петли Генле у млекопитающих. В кишечнике регуляция NHE3 возникает резко как элемент пищеварения и подавляется сразу после приема пищи. NHE3-нулевые мыши демонстрируют нарушенный баланс натрия и жидкости, что подчеркивает роль NHE3 в сохранении объемного гомеостаза и указывает на то, что NHE3 является вносит основной вклад в поглощение натрия в кишечнике. Кроме того, недавние исследования *in vivo* показали, что ингибирование NHE3 вызывает уменьшение всасывания фосфатов в кишечнике (Orlowski, J., et al., *Pflugers Arch. -Eur. J. Physiol.*, 2004, 447:549-565, King, A.J., et al., *Sci. Transl. Med.*, 2018, 10, 1-17).

Чрезмерное потребление натрия, которое повсеместно встречается в западном питании, тесно связано с проявлением гипертонии, что, в свою очередь, связано с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний и заболеваний почек. Поддержание оптимального уровня потребления натрия может помочь контролировать артериальное давление и предотвратить сердечно-сосудистые заболевания и заболевания почек (Weintraub, W.S., et al., *J. Am. Coll. Cardiol*, 2015, 65 (10), 1042-1050).

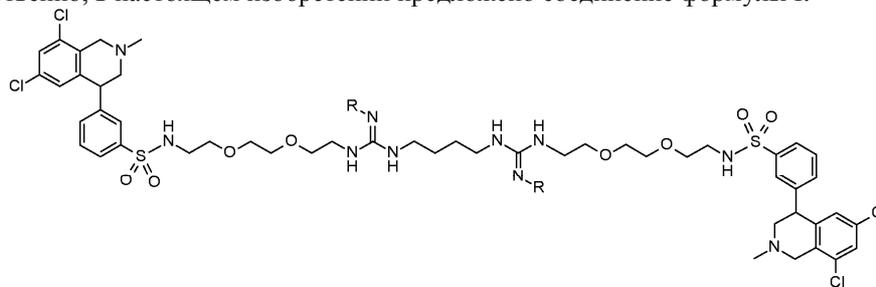
Снижение почечного клиренса при хронической болезни почек (ХБП) и терминальной стадии почечной недостаточности (ESRD) приводит к увеличению фосфатной нагрузки, что может стимулировать вторичный почечный гиперпаратиреоз и в конечном итоге привести к гиперфосфатемии (Wolf M., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2010, 21, 1427-1435). ХБП является наиболее частой причиной гиперфосфатемии не только у людей, но и у взрослых кошек и собак (Kidder, A., et al., *J. Feline Med. Sur.*, 2009, 11, 913-924). Документально подтвержденным последствием гиперфосфатемии является сердечно-сосудистое заболевание (ССЗ), которое может проявляться кальцификацией сосудов и клапанов сердца, гипертрофией левого желудочка, сердечной недостаточностью, аритмией и внезапной сердечной смертью (Fujii, H., et al., *Clin. Exp. Nephrol.*, 2017, 21 (S1), S53-S63). Вторичный гиперпаратиреоз, возникающий в результате повышенного содержания фосфатов, также может привести к заболеванию костей (Yuen, N.K., et al., *Perm. J.*, 2016, 20(3), 15-127).

Эффективное снижение абсорбции фосфатов в кишечнике за счет ограничения фосфатов в пище и применения ингибиторов абсорбции фосфатов снизит фосфатную нагрузку при ХБП и поможет уменьшить последствия, способствующие сердечно-сосудистым заболеваниям, заболеваниям костей и дальнейшему ухудшению функции почек.

В WO 2010/078449 раскрыты соединения и способы ингибирования NHE-опосредованного антипорта при лечении расстройств, связанных с задержкой жидкости или солевой перегрузкой и расстройствами желудочно-кишечного тракта. В WO 2014/169094 раскрыты NHE3-связывающие соединения и способы ингибирования транспорта фосфата.

В свете вышеизложенного признано, что чрезмерная абсорбция натрия и фосфата в кишечнике способствует увеличению частоты возникновения заболеваний, таких как гипертония, ХБП, ССЗ, болезни костей и связанная с ними смертность. Соответственно, существует потребность в альтернативных способах лечения этих состояний, в частности в способах лечения, которые ингибируют NHE3. В частности, существует потребность в соединениях, которые являются эффективными для уменьшения абсорбции натрия и фосфата *in vivo*, обладая высокой степенью селективности в отношении ингибирования NHE3. Кроме того, желательно иметь соединения-ингибиторы NHE3, которые являются эффективными в комбинации с соединениями-ингибиторами NPT2b.

Соответственно, в настоящем изобретении предложено соединение формулы I:

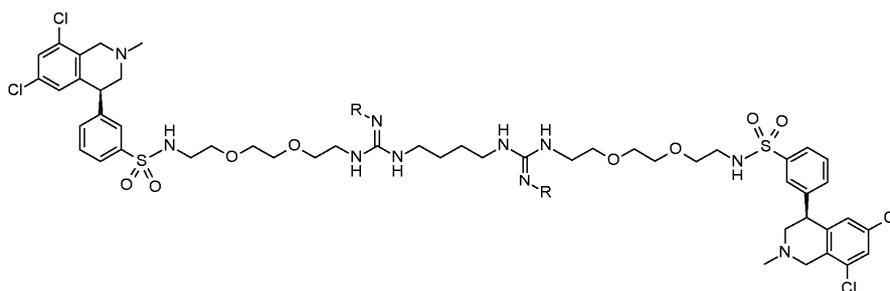


Формула I

где оба R представляют собой CN, или оба R представляют собой C(O)NH₂, или его фармацевтически приемлемая соль.

В конкретном варианте реализации оба R представляют собой C(O)NH₂.

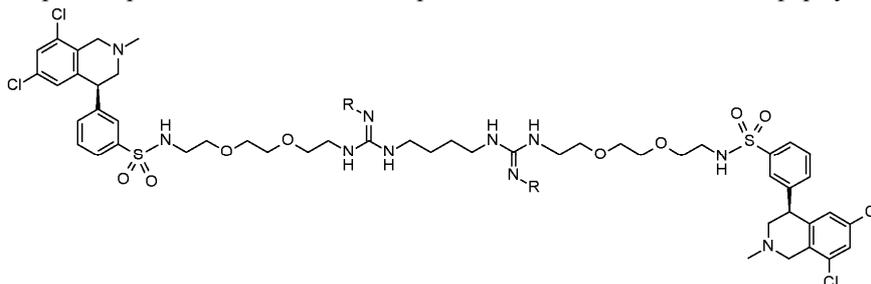
В конкретном варианте реализации соединение представляет собой соединение формулы:



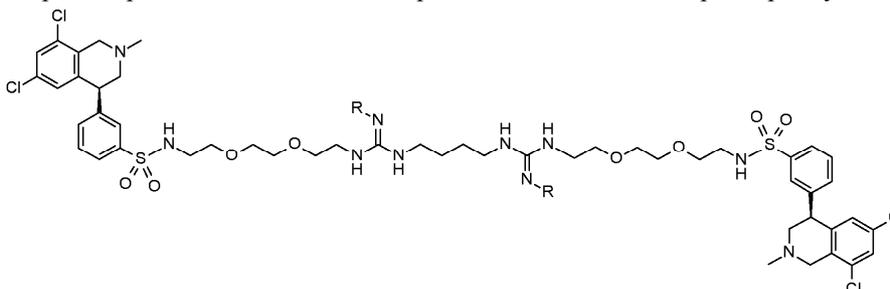
Формула Ia

или его фармацевтически приемлемую соль.

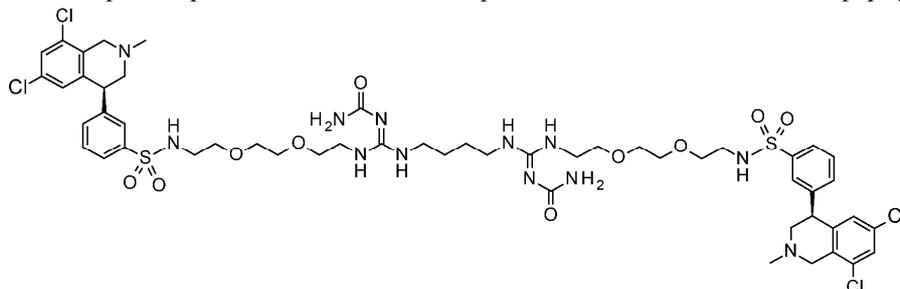
В другом варианте реализации соединение представляет собой соединение формулы:



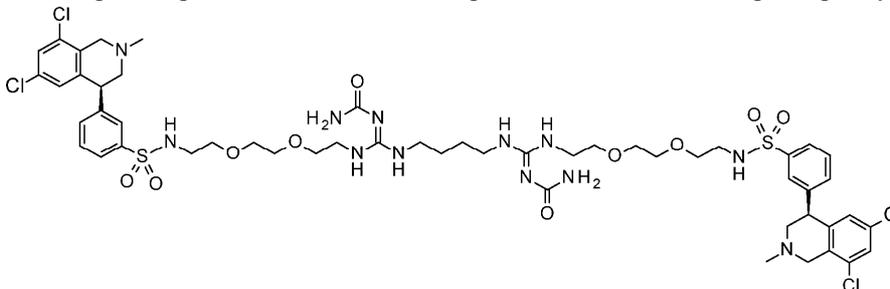
В другом варианте реализации соединение представляет собой дигидрохлоридную соль:



В конкретном варианте реализации соединение представляет собой соединение формулы:



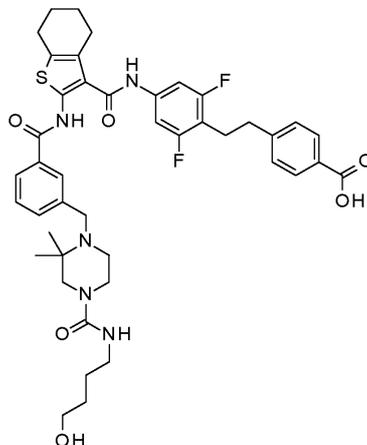
В конкретном варианте реализации соединение представляет собой дигидрохлоридную соль:



В настоящем изобретении также предложен способ лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из ХБП, гиперфосфатемии, вторичного гиперпаратиреоза, сердечной недостаточности, гипертензии и сердечно-сосудистых заболеваний, включающий введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложен способ лечения ХБП у кошек, включающий введение кошке, нуждающейся в этом, терапевтически эффективного количества

соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из ХБП, гиперфосфатемии, вторичного гиперпаратиреоза, сердечной недостаточности и ССЗ, включающий введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективной комбинации соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с соединением формулы II:



Формула II

или его фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложен способ лечения ХБП у кошек, включающий введение кошке, нуждающейся в этом, терапевтически эффективной комбинации соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с соединением формулы II или его фармацевтически приемлемой солью.

Кроме того, в настоящем изобретении предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии. В частности, в настоящем изобретении предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения для лечения ХБП, гиперфосфатемии, вторичного гиперпаратиреоза, сердечной недостаточности, гипертонии или ССЗ. В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения для лечения ХБП у кошек.

Кроме того, в настоящем изобретении предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с соединением формулы II или его фармацевтически приемлемой солью при лечении ХБП, гиперфосфатемии, вторичного гиперпаратиреоза, сердечной недостаточности или ССЗ. В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с соединением формулы II или его фармацевтически приемлемой солью при лечении ХБП у кошек.

Кроме того, в настоящем изобретении предложено соединение формулы II или его фармацевтически приемлемая соль для применения одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с соединением формулы I или его фармацевтически приемлемой солью при лечении ХБП, гиперфосфатемии, вторичного гиперпаратиреоза, сердечной недостаточности или ССЗ. В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложено соединение формулы II или его фармацевтически приемлемая соль для применения одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с соединением формулы I или его фармацевтически приемлемой солью при лечении ХБП у кошек.

Кроме того, в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение согласно формулы I или его фармацевтически приемлемую соль с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, носителем или разбавителем.

Кроме того, в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, носителем или разбавителем, дополнительно содержащая соединение формулы II или его фармацевтически приемлемую соль.

Кроме того, в настоящем изобретении предложено применение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения ХБП, гиперфосфатемии, вторичного гиперпаратиреоза, сердечной недостаточности, гипертонии или ССЗ. В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для получения лекарственного средства для лечения ХБП у кошек.

Соединения и комбинации согласно настоящему изобретению можно применять для лечения заболеваний и состояний, связанных с натриевым и/или фосфатным дисбалансом, включая: гиперфосфатемии, в частности гиперфосфатемии при ESRD или ХБП или семейную гиперфосфатемии; гиперпаратиреоза;

реоз, в частности вторичный гиперпаратиреоз, связанный с ХБП; кальций-фосфатные камни в почках; кальциноз сердечного клапана, связанный с ХБП или ESRD; переломы костей, связанные с ХБП; кальцифилаксию; опухолевый кальциноз; и острую болезнь почек.

В конкретном варианте реализации соединение формулы II представляет собой свободную кислоту. В конкретном варианте реализации соединение формулы II представляет собой динатриевую соль. Соединение формулы II в виде свободной кислоты в настоящем изобретении называется "соединение А".

В настоящем документе термин "лечение" или "лечить" включает ограничение, замедление, прекращение или обращение вспять прогрессирования или степени тяжести существующего симптома или нарушения.

В одном варианте реализации млекопитающее, подлежащее лечению, представляет собой человека. В другом варианте реализации млекопитающее представляет собой кошку или собаку, предпочтительно кошку.

Применяемый в настоящем документе термин "эффективное количество" относится к количеству или дозе соединения формулы I или II или его фармацевтически приемлемой соли, которое при однократном или многократном введении млекопитающему обеспечивает требуемый эффект у пациента, подлежащего диагностике или лечению.

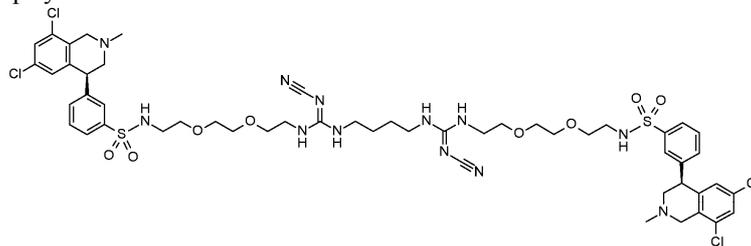
Эффективное количество может установить специалист в данной области техники, используя известные технологии и наблюдая результаты, полученные при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного количества для пациента, рассматривается множество факторов, включая, но не ограничиваясь ими: вид пациента; его размер, возраст, питание и общее состояние здоровья; конкретное вовлеченное заболевание или расстройство; степень вовлеченности или тяжесть заболевания или расстройства; реакцию отдельного пациента; конкретное вводимое соединение; способ введения; характеристики биодоступности вводимого лекарственного средства; выбранную схему введения; применение сопутствующих лекарственных средств; и другие имеющие отношение обстоятельства. Соединения формулы I и II эффективны при суточной дозировке, которая находится в диапазоне от примерно 0,01 до примерно 15 мг/кг массы тела.

Соединения формулы I или II составляют в фармацевтические композиции, которые вводят любым способом, обеспечивающим биодоступность соединения. Предпочтительно, указанные композиции предназначены для перорального введения. Такие фармацевтические композиции и способы их получения хорошо известны в данной области техники (см., например, Remington, J. P., "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", L.V. Allen, Editor, 22 изд., Pharmaceutical Press, 2012).

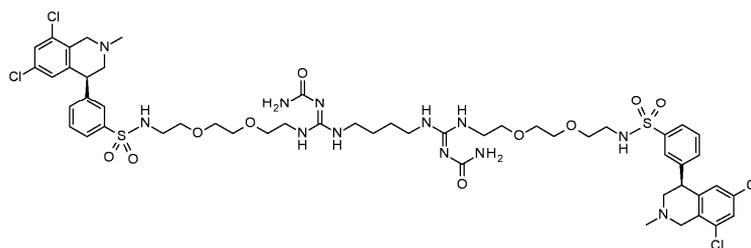
Соединения формулы I и их фармацевтически приемлемые соли можно применять в терапевтических целях настоящего изобретения, при этом некоторые конфигурации являются предпочтительными. В следующем списке соединений согласно настоящему изобретению описаны такие конфигурации. Следует понимать, что эти предпочтения применимы как в терапевтических целях, так и к соединениям согласно настоящему изобретению.

Квалифицированному специалисту будет понятно, что для соединений, в которых оба R представляют собой C(O)NH₂, фрагмент амидинмочевины может существовать либо в E-, либо в Z-конфигурации, и может легко переходить из одной в другую. Соединения согласно настоящему изобретению включают как изомеры E, так и Z, а также их смеси.

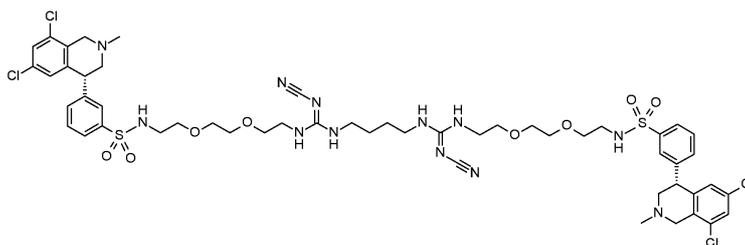
Соединения формулы I включают:



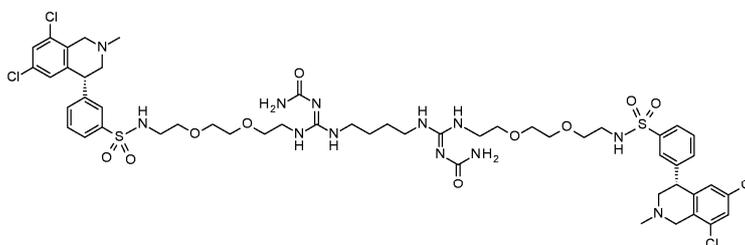
Формула Ia'



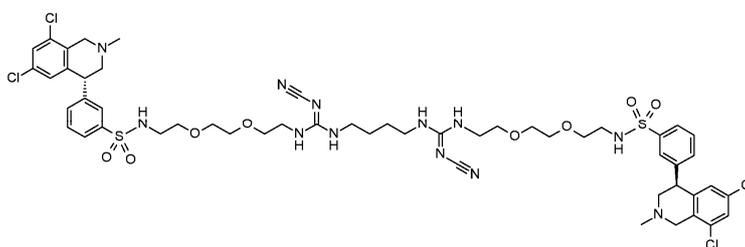
Формула Ia''



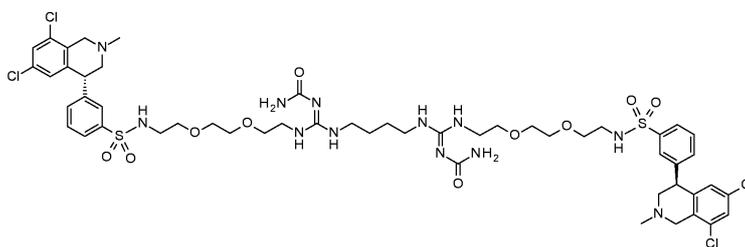
Формула Ib'



Формула Ib''



Формула Ic'



Формула Ic''

или их фармацевтически приемлемые соли.

Хотя настоящее изобретение охватывает все индивидуальные энантимеры и диастереомеры, а также смеси энантимеров указанных соединений, включая рацематы, соединение формулы Ia' и формулы Ia'' и его фармацевтически приемлемые соли являются особенно предпочтительными. В частности, дигидрохлоридная соль соединения формулы Ia'' является предпочтительной.

Отдельные энантимеры могут быть отделены или разделены специалистом в данной области в любой удобный момент синтеза соединений согласно настоящему изобретению такими способами, как методики селективной кристаллизации, хиральная хроматография (см., например, J. Jacques, et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, и E.L. Eliel and S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994), или сверхкритическая жидкостная хроматография (SFC) (см., например, T. A. Berger, "Supercritical Fluid Chromatography Primer" Agilent Technologies, July 2015).

Фармацевтически приемлемая соль соединения формулы I может быть получена, например, реакцией соответствующей формы свободного основания соединения формулы I и соответствующей фармацевтически приемлемой кислоты в подходящем растворителе в стандартных условиях, хорошо известных в данной области техники (см. например, Bastin, R.J., et al; Org. Process. Res. Dev., 4, 427-435, 2000 and Berge, S.M., et al.; J. Pharm. Sci., 66, 1-19, 1977). В частности, предпочтительная соль соединения формулы I представляет собой дигидрохлоридную соль.

Фармацевтически приемлемая соль соединения формулы II может быть получена, например, реакцией соответствующей формы свободной кислоты соединения формулы II и соответствующего фармацевтически приемлемого основания в подходящем растворителе в стандартных условиях, хорошо известных в данной области техники (см. например, Bastin, R.J., et al; Org. Process. Res. Dev., 4, 427-435, 2000 and Berge, S.M., et al.; J. Pharm. Sci., 66, 1-19, 1977). В частности, предпочтительная соль соединения

формулы II представляет собой динатриевую соль.

В WO 2018/034883 описан род соединений, включая соединения Формулы II, которые являются ингибиторами натрийзависимого фосфатного котранспортера 2b (NPT2b или NaPi2b). NPT2b обнаруживается на поверхности просвета тонкого кишечника, где он способствует абсорбции фосфатов за счет активного транспорта. Соединение формулы II можно получить способами, описанными в WO 2018/034883.

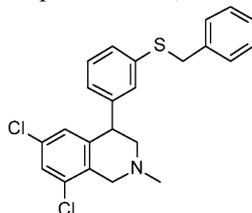
Соединения формулы I или их соли получают с помощью множества методик, известных специалистам в данной области техники, некоторые из которых представлены ниже в способах получения и примерах. Продукты на каждой стадии могут быть выделены с помощью обычных способов, хорошо известных в данной области техники, включая экстракцию, выпаривание, осаждение, хроматографию, фильтрование, растирание и кристаллизацию. Реагенты и исходные вещества легко доступны специалистам обычной квалификации в данной области техники. Не ограничивая объем изобретения, следующие способы получения и примеры представлены для дополнительной иллюстрации изобретения. Дополнительно, специалисту в данной области техники понятно, что соединение формулы I может быть получено с применением исходных материалов или промежуточных соединений с соответствующей необходимой стереохимической конфигурацией, которое может быть получено специалистом в данной области техники.

Некоторые сокращения определены следующим образом: "ACN" относится к ацетонитрилу; "BCECF-AM" относится к 2',7'-бис(2-карбоксиэтил)-5(6)-карбоксифлуоресцеин ацетоксиметилловому сложному эфиру; "БСА" относится к альбумину бычьей сыворотки; "ДХМ" относится к метиленхлориду или дихлорметану; "ДМСО" относится к диметилсульфоксиду; "EtOAc" относится к этилацетату; "ЭР/МС" относится к масс-спектрометрии с электрораспылением; "EMS" относится к этилметансульфонату; "EtOH" относится к этанолу или этиловому спирту; "ФБС" относится к фетальной бычьей сыворотке; "ч" обозначает час или часы; "HEPES" относится к 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоте; "ВЭЖХ" относится к высокоэффективной жидкостной хроматографии; "IC50" относится к концентрации ингибитора при полумаксимальном ингибировании; "ЖХ-МС" относится к жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии; "MeOH" относится к метанолу; "мин" относится к минуте или минутам; "MTBE" относится к метил трет-бутиловому эфиру; "m/z" относится к отношению массы к заряду; "Pd(dba)₂" относится к бис(добензилиденацетон)палладию (0); "КТ" относится к комнатной температуре; "ТСХ" относится к тонкослойной хроматографии.

ЖХ-МС проводили на системе для жидкостной хроматографии AGILENT® HP1260. Измерения масс-спектрометрии выполняли с электрораспылением (записанные в положительном и/или отрицательном режиме), и проводили на квадрупольном масс-спектрометре с масс-селективным детектором, подключенном к системе ВЭЖХ, которая может быть оснащена ELSD или нет. Условия ЖХ-МС (низкое значение pH): колонка: PHENOMENEX® GEMINI® NX C18 2,0×50 мм 3,0 мкм, 110 Å; градиент: 5-95% В в течение 1,5 мин, а затем 95% В в течение 0,5 мин; температура колонки: 50°C +/- 10°C; скорость потока: 1,2 мл/мин; объем впрыска 1 мкл; растворитель А: деионизированная вода с 0,1% HCOOH; растворитель В: ACN с 0,1% муравьиной кислоты; длина волны 200-400 нм и 212-216 нм. Если ВЭЖХ оснащена ELSD (испарительным детектором светорассеяния), настройки являются следующими: температура испарителя 45°C, температура распылителя 40°C и расход газа 1,6 ст.л/мин. Альтернативные условия ЖХ-МС (высокий pH): колонка: колонка Waters xBridge® C18 2,1×50 мм, 3,5 мкм; градиент: 5-95% В за 1,5 мин, затем 95% В за 0,50 мин; температура колонки: 50°C +/- 10°C; скорость потока: 1,2 мл/мин; объем впрыска 1 мкл; растворитель А: 10 mM NH₄HCO₃, pH 9; растворитель В: ACN; длина волны: 200-400 нм и 212-216 нм; при наличии ELSD: температура испарителя 45°C, температура распылителя 40°C и расход газа 1,60 ст. л/мин.

Получение 1.

4-(3-Бензилсульфанилфенил)-6,8-дихлор-2-метил-3,4-дигидро-1H-изохинолин

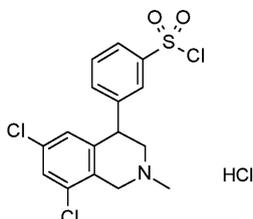


Три реакции проводили параллельно в одинаковом масштабе. Для каждой реакции получали два раствора: раствор 1 и раствор 2. Раствор 1: к раствору 4-(3-бромфенил)-6,8-дихлор-2-метил-3,4-дигидро-1H-изохинолина (54,0 г, 145,5 ммоль) в ксилоле (1,08 л) добавляли Pd(dba)₂ (3,35 г, 5,82 ммоль) и Ксантфос (3,37 г, 0,04 экв. 5,82 ммоль) при 15°C в атмосфере азота. Смесь перемешивали в течение 1 ч. Раствор 2: к смеси K₂CO₃ (10,1 г, 72,7 ммоль) в ксилоле (1,08 л) по каплям при 0°C в атмосфере азота добавляли фенилметантиол (27,1 г, 218,3 ммоль). Смесь перемешивали в течение 1 ч при 15°C. Раствор 1 по каплям добавляли к раствору 2 при 15°C, и смесь перемешивали при 140°C в течение 12 ч.

Объединяли три реакционные смеси и промывали водой (500 мл). Органический слой концентрировали и очищали хроматографией на силикагеле с применением градиента от 1 до 17% EtOAc в петролейном эфире с получением указанного в заголовке соединения (92 г, 50%). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,28-7,17 (m, 8H), 7,05-7,04 (m, 1H), 7,00-6,95 (m, 1H), 6,74-6,69 (m, 1H), 4,15-4,04 (m, 3H), 3,76 (d, J=16,0 Гц, 1H), 3,47 (d, J=16,0 Гц, 1H), 2,90 (dd, J=11,2, 7,2 МГц, 1 H), 2,50-2,42 (m, 4H).

Получение 2.

3-(6,8-дихлор-2-Метил-3,4-дигидро-7Н-изохинолин-4-ил)бензолсульфонилхлорид; гидрохлоридная соль

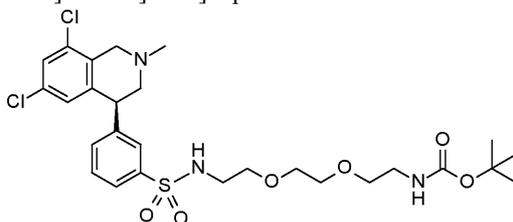


Две реакции проводили параллельно в одинаковом масштабе. Для каждой реакции к перемешиваемой смеси 4-(3-бензилсульфанилфенил)-6,8-дихлор-2-метил-3,4-дигидро-1Н-изохинолина (50,0 г, 121 ммоль), уксусной кислоты (52,17 г, 868,8 ммоль) и воды (62 мл) в ACN (690 мл) частями добавляли 1,3-дихлор-5,5-диметилимидазолидин-2,4-дион (47,5 г, 241 ммоль) при 0°C. Смесь перемешивали при температуре от 0 до 5°C в течение 2 ч, затем концентрировали реакционную смесь под вакуумом. К каждой реакции добавляли МТВЕ (200 мл) и HCl (4 М раствор в 1,4-диоксане, 10 мл), и реакционные смеси объединяли вместе. Перемешивали в течение 30 мин, и твердое вещество собирали фильтрацией. Твердое вещество промывали МТВЕ (100 мл) с получением указанного в заголовке соединения (112 г), которое применяли без дополнительной очистки. Предполагая количественный выход, чистота была оценена как 92% мас./мас., исходя из теоретического выхода 103 г. ТСХ (1:6 EtOAc : петролейный эфир) R_f=0,05.

Получение 3.

трет-Бутил

N-[2-[2-[2-[[3-[(4S)-6,8-дихлор-2-метил-3,4-дигидро-1Н-изохинолин-4-ил]фенил]сульфонамино]этокси]этокси]этил]карбамат



К раствору трет-бутил N-[2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]этил]карбамата (5,22 г, 21,0 ммоль) и триметиламина (6,38 г, 8,79 мл, 63,0 ммоль, 3,00 экв.) в безводном ДХМ (120 мл) добавляли рацемический 3-(6,8-дихлор-2-метил-3,4-дигидро-1Н-изохинолин-4-ил)бензолсульфонилхлорид (Abacipharm, 8,21 г, 21,0 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в атмосфере азота в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали под вакуумом. К маслянистому остатку добавляли EtOAc (50 мл), отфильтровывали твердые вещества, и фильтрат концентрировали под вакуумом с получением оранжевого масла. Очищали колоночной хроматографией на силикагеле, проводя элюирование EtOAc, с получением рацемического соединения (6,92 г, 55%) в форме бесцветного масла. ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,75 (d, J=8,0 Гц, 1H), 7,67 (s, 1H), 7,44 (t, J=7,6 Гц, 1H), 7,36 (d, J=7,2 Гц, 1H), 7,23 (d, J=2,0 Гц, 1H), 6,71 (d, J=1,2 Гц, 1H), 5,42-5,05 (br m, 1H), 4,29 (t, J=6,0 Гц, 1H), 3,73 (d, J=16,2 Гц, 1H), 3,57 (d, J=15,8 Гц, 1H), 3,55-3,46 (m, 8H), 3,34-3,25 (m, 2H), 3,14-3,08 (m, 2H), 2,97 (dd, J=11,5, 5,29 Гц, 1H), 2,59 (dd, J=11,5, 7,2 Гц, 1H), 2,46 (s, 3H), 1,41 (s, 9H).

Энантиомеры разделяли на колонке Chiralpak® AD (8×35 см) (скорость потока 400 мл/мин, детекция при 260 нм) при 11 впрысках 629 мг, проводя элюирование смесью 95:5 EtOH:ACN, с получением указанного в заголовке соединения (2,94 г, 23%) в качестве изомера с вторым элюированием. Хиральная ВЭЖХ (колонка: Chiralpak® AD-H 4,6×150 мм, скорость потока: 0,6 мл/мин, детекция: 250 нм, элюент: 95:5 EtOH:ACN) показывает >99% э.и.

Альтернативный синтез.

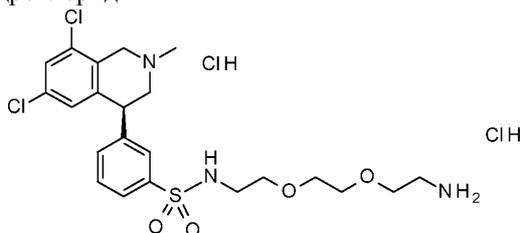
К раствору трет-бутил N-[2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]этил]карбамата (57,1 г, 230 ммоль) в ДХМ (1,70 л) добавляли триэтиламин (65,2 г, 645 ммоль) при 0°C. Частями к смеси добавляли 3-(6,8-дихлор-2-метил-3,4-дигидро-1Н-изохинолин-4-ил)бензолсульфонилхлорид; гидрохлоридную соль (материал, полученный в соответствии с Получением 2; 84,0 г, 181 ммоль) при 0°C. Смесь нагревали до 25°C и перемешивали в течение 4 ч. Реакционную смесь объединяли с двумя реакционными смесями, полученными, по существу, как описано выше, начиная с 3-(6,8-дихлор-2-метил-3,4-дигидро-1Н-изохинолин-4-ил)бензолсульфонилхлорида; гидрохлоридной соли (материал, полученный в соответствии с получением 2; 52 г, 112 ммоль каждого, всего 104 г, 224 ммоль). Полученную смесь выливали в ледяную воду (1,8 л),

затем органический слой промывали водой (2×1,5 л) и концентрировали с получением желтого остатка. Очищали хроматографией на силикагеле с применением градиента от 1 до 2% MeOH в ДХМ с получением рацемического соединения (157 г, выход 64%) в форме желтого масла.

Этот рацемический материал (157 г, 261 ммоль) объединяли с дополнительным рацемическим материалом (23 г, 38 ммоль), полученным, как описано выше. Энантимеры разделяли с помощью SFC с применением колонки Chiralpak® AD-H (5 мкм, 3×25 см) (скорость потока 70 г/мин, УФ-детекция при 220 нМ), проводя элюирование с применением 70:30 CO₂: (0,1% NH₄OH) в MeOH с получением указанного в заголовке соединения (50 г, 28%) в форме желтой смолы, изомера со вторым элюированием, >99% э.и. ЭР/МС (m/z): (³⁵Cl/³⁷Cl) 602/604 [M+H]⁺.

Получение 4.

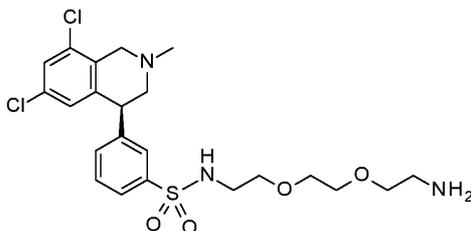
N-[2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]этил]-3-[(4S)-6,8-дихлор-2-метил-3,4-дигидро-1H-изохинолин-4-ил]бензолсульфонамида дигидрохлорид



К трет-бутил N-[2-[2-[2-[[3-[(4S)-6,8-дихлор-2-метил-3,4-дигидро-1H-изохинолин-4-ил]фенил]сульфониламино]этокси]этокси]этил]карбамату (2,94 г, 4,88 ммоль) добавляли 4M хлористый водород в 1,4-диоксане (10 мл, 40 ммоль) и перемешивали полученный раствор при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали под вакуумом до получения белой пены (2,85 г, >100%). Сушили под глубоким вакуумом в течение ночи и применяли без дополнительных манипуляций. ЭР/МС m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 502/504 [M+H]⁺

Получение 5.

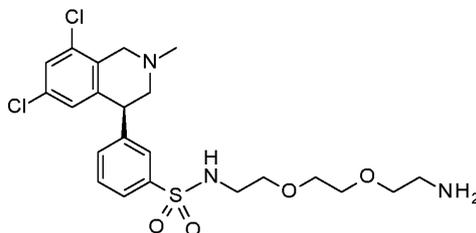
N-[2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]этил]-3-[(4S)-6,8-дихлор-2-метил-3,4-дигидро-1H-изохинолин-4-ил]бензолсульфонамид



Очищали N-[2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]этил]-3-[(4S)-6,8-дихлор-2-метил-3,4-дигидро-1H-изохинолин-4-ил]бензолсульфонамида дигидрохлорид (992 мг, 1,84 ммоль) с применением колонки 10 g Isolute® SCX с получением 740 мг свободного основания в форме прозрачного бесцветного полутвердого вещества (740 мг, 80%).

Получение 6.

N-[2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]этил]-3-[(4S)-6,8-дихлор-2-метил-3,4-дигидро-1H-изохинолин-4-ил]бензолсульфонамид

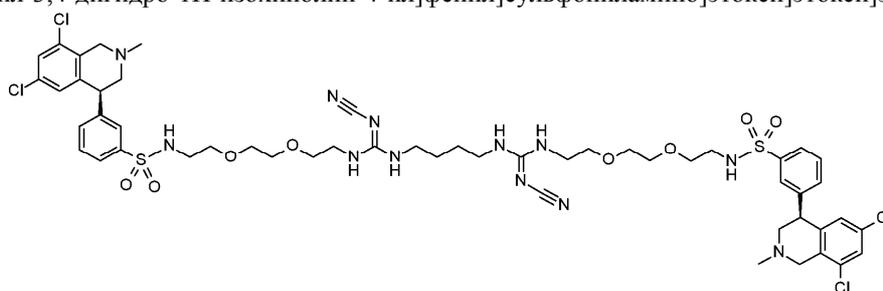


К трет-бутил N-[2-[2-[2-[[3-[(4S)-6,8-дихлор-2-метил-3,4-дигидро-1H-изохинолин-4-ил]фенил]сульфониламино]этокси]этокси]этил]карбамату (48 г, 80 ммоль) в MeOH (190 мл) при 15°C добавляли 4 M хлористоводородную кислоту в 1,4-диоксане (100 мл, 400 ммоль), и полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Растворители удаляли под вакуумом, и остаток растворяли в воде (150 мл). К этому раствору добавляли 5н. NaOH (30 мл) и 2н. NaOH (50 мл) до pH 9-10, затем добавляли 20% водный раствор Na₂CO₃ (75 мл), чтобы довести раствор до pH 11. Водную смесь экстрагировали посредством EtOAc (2×200 мл, затем 1×100 мл). Органические слои объединяли и промывали смесью насыщенного водного раствора хлорида натрия (120 мл) и 20% Na₂CO₃ (30 мл). Органическую часть сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали под вакуумом. Остаток растворяли в толуоле и концентрировали под вакуумом, затем указанный прием повторяли еще два раза.

Остаток растворяли в ДХМ и концентрировали под вакуумом, затем указанный прием повторяли еще два раза с получением темно-желтого масла (42 г, 94%), чистота приблизительно равна 90% масс. на основании сравнения ^1H -ЯМР с анизолом в качестве внутреннего стандарта. ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,76-7,72 (m, 1H), 7,68-7,66 (m, 1H), 7,43 (t, $J=7,6$ Гц, 1H), 7,36-7,33 (m, 1H), 7,23 (d, $J=2,1$ Гц, 1H), 6,74-6,72 (m, 1H), 4,28-4,22 (m, 1H), 3,67 (d, $J=16,2$ Гц, 1H), 3,62-3,49 (m, 9H), 3,11 (t, $J=4,6$ Гц, 2H), 2,91 (dd, $J=11,8, 5,5$ Гц, 1H), 2,87 (t, $J=5,1$ Гц, 2H), 2,58 (dd, $J=11,7, 7,4$ Гц, 1H), 2,44 (s, 3H). ЭР/МС m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 502/504 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Пример 1.

2-Циано-1-[4-[N'-циано-N-[2-[2-[2-[[3-[(4S)-6,8-дихлор-2-метил-3,4-дигидро-1H-изохинолин-4-ил]фенил]сульфониламино]этокси]этокси]этил]карбаамидоил]амино]бутил]-3-[2-[2-[2-[[3-[(4S)-6,8-дихлор-2-метил-3,4-дигидро-1H-изохинолин-4-ил]фенил]сульфониламино]этокси]этокси]этил]гуанидин



К раствору N-[2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]этил]-3-[(4S)-6,8-дихлор-2-метил-3,4-дигидро-1H-изохинолин-4-ил]бензолсульфонамида (получен согласно Получению 5; 740 мг, 1,47 ммоль) в 1,4-диоксане (10 мл) и пиридине (10 мл) добавляли дифеноксиметиленцианамид (351 мг, 1,47 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в атмосфере азота в течение ночи. Добавляли бутан-1,4-диамин (65 мг, 0,74 ммоль), и нагревали при 60°C в течение 24 ч, затем нагревали при 90°C в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры. Реакционную смесь разбавляли посредством EtOAc, дважды промывали 5% водным раствором карбоната калия, сушили над безводным сульфатом магния, фильтровали и концентрировали под вакуумом с получением оранжевого масла. Неочищенную смесь очищали хроматографией на колонке с силикагелем, проводя элюирование градиентом от 0 до 10% MeOH в ДХМ, с получением указанного в заголовке соединения в форме желтой пены (591 мг, 67%). ЭР/МС m/z (^{35}Cl) 1193 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

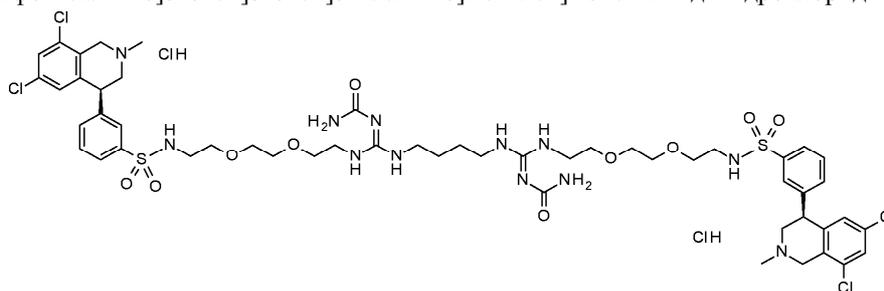
Альтернативный синтез.

К раствору N-[2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]этил]-3-[(4S)-6,8-дихлор-2-метил-3,4-дигидро-1H-изохинолин-4-ил]бензолсульфонамида (получен в соответствии с Получением 6; чистота 90% масс., 24,5 г, 44 ммоль) в 1,4-диоксане (240 мл) добавляли пиридин (17,7 мл, 219 ммоль) и дифеноксиметиленцианамид (10,5 г, 44 ммоль), и перемешивали при комнатной температуре в атмосфере азота в течение ночи. К реакционной смеси добавляли бутан-1,4-диамин (1,93 г, 21,9 ммоль), реакционную смесь разделяли на четыре равные части и нагревали каждую часть до 90°C в течение 21 ч. К каждой части реакции добавляли бутан-1,4-диамин (102 мг, 1,16 ммоль) и 1,4-диоксан (5 мл) и продолжали нагревание при 90°C в течение 23 ч. К частям реакционной смеси добавляли бутан-1,4-диамин (42 мг, 0,48 ммоль) и 1,4-диоксан (5 мл), показывая соотношение промежуточного соединения цианоизоамочевины : указанного в заголовке соединения более 1:5, как определено с помощью ЖХ-МС. Продолжали нагревать все части реакционной смеси при 90°C в течение ночи, а затем охлаждали до комнатной температуры. Части реакции объединяли. Объединяли смесь с двумя другими партиями, полученными по существу таким же образом с применением N-[2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]этил]-3-[(4S)-6,8-дихлор-2-метил-3,4-дигидро-1H-изохинолин-4-ил]бензолсульфонамида (чистота 90 мас.%) (10,05 г, 18,00 ммоль и 5,20 г, 9,32 ммоль соответственно). Растворители удаляли при пониженном давлении, остаток растворяли в ДХМ (250 мл), затем промывали органические слои 5% водным раствором карбоната калия (2x80 мл). Объединяли водные части после промывки и экстрагировали посредством ДХМ (2x40 мл). Объединяли все органические части после промывки вместе и промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (80 мл). Органические слои сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением желтовато-коричневого масла. Неочищенный материал очищали хроматографией на колонке с силикагелем, проводя элюирование градиентом от 8 до 16% EtOH в ДХМ. Затем дважды повторно очищали материал хроматографией на силикагеле, проводя элюирование градиентами от 5 до 12% и от 2 до 12% MeOH в ДХМ. Повторно очищали неочищенные фракции хроматографией на силикагеле с градиентом от 2 до 12% MeOH в ДХМ, и объединяли чистые вещества с получением указанного в заголовке соединения в форме почти белого пенистого твердого вещества (15,3 г, 36%). ЭР/МС m/z (^{35}Cl) 1193 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Пример 2.

[[4-[N'-Карбамоил-N-[2-[2-[2-[[3-[(4S)-6,8-дихлор-2-метил-3,4-дигидро-1H-изохинолин-4-ил]фенил]сульфониламино]этокси]этокси]этил]карбаамидоил]амино]бутиламино]-[2-[2-[2-[[3-[(4S)-

6,8-дихлор-2-метил-3,4-дигидро-1Н-изохинолин-4-ил[фенил]сульфо[амино]этокси[этокси]этиламино]метилен]мочевины дигидрохлорид



К примеру 1 (670 мг, 0,562 ммоль) добавляли трифторуксусную кислоту (10 мл) и воду (1 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Остаток растворяли в минимальном количестве MeOH и очищали через колонку 10 g Isolute SCX® с получением желтой пены (629 мг). Очищали препаративной ВЭЖХ [колонка: Phenomenex® Kinetex® EVO C₁₈ 100×30 мм, размер частиц 5 мкм, встроенный нагреватель при 50°C; элюент: от 51 до 86% (5% MeOH в 10 mM NH₄HCO₃) в ACN] с получением указанного в заголовке соединения в виде свободного основания в форме оранжевого масла (253 мг, 37%). ЭР/МС m/z (³⁵Cl) 1229 [M+H]⁺. Во флаконе растворяли соединение в виде свободного основания (223 мг, 0,181 ммоль) в ДХМ (0,5 мл) и по каплям при встряхивании добавляли хлористоводородную кислоту (1M раствор в диэтиловом эфире, 1 мл). Из раствора выпадали в осадок твердые вещества белого цвета. Смесь встряхивали в течение 5 минут, и затем концентрировали под вакуумом с получением указанного в заголовке соединения в форме мелкодисперсного белого порошка (236 мг, 100%). ЭР/МС m/z (³⁵Cl) 1229 [свободное основание M+H]⁺, 1227 [свободное основание N-H]⁺.

Альтернативный синтез.

Две равные части смеси получали следующим образом: для каждой части смешивали соединение примера 1 (5,1 г, 4,3 ммоль), 4 M хлористоводородную кислоту в диоксане (50 мл, 200 ммоль) и воду (25 мл). Каждый раствор нагревали до 65°C в течение 2 ч. Смеси охлаждали до комнатной температуры и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, затем объединяли их вместе с другой партией, полученной по существу таким же образом, начиная с соединения Примера 1 (3,1 г, 2,6 ммоль). Смесь концентрировали под вакуумом. К остатку добавляли воду/EtOH (1:2, 100 мл) и концентрировали под вакуумом. Указанный прием повторяли три раза. К остатку добавляли EtOH и перемешивали при 45°C в течение 10 мин, затем концентрировали под вакуумом. Указанный прием повторяли три раза. Остаток сушили под вакуумом при комнатной температуре в течение 22 ч. К остатку добавляли еще одну партию продукта, полученного по существу таким же образом, как описано выше для примера 1 (1 г, 0,8 ммоль). Сушили под вакуумом при комнатной температуре в течение 23 ч, при 50°C в течение 16 ч, при 55°C в течение 6 ч и при комнатной температуре в течение 72 ч с получением указанного в заголовке соединения (14,7 г, 94%). ЭР/МС m/z (³⁵Cl) 1229 [свободное основание M+H]⁺.

Методы анализа.

Ингибирующая активность NHE3 *in vitro*.

Для анализа NHE3, клетки, избирательно экспрессирующие NHE3, получали путем сверхэкспрессии человеческого NHE3 в эндогенно NHE-дефицитной линии клеток. NHE-дефицитную линию клеток с получали с помощью индуцированного химическим путем мутагенеза. После мутагенеза NHE-дефицитные клетки отбирали, подвергая нагруженные литием (Li) клетки воздействию кислой внеклеточной среды. В этих условиях NHE обменивает внутриклеточный Li⁺ на внеклеточные протоны, таким образом, только NHE-дефицитные клетки могут избежать токсического внутриклеточного ацидоза и выжить.

NHE-дефицитную линию клеток, NHD C8, получали путем мутагенеза и селекции из линии клеток Dede (ATCC® CCL-39™). Мутагенез индуцировали обработкой клеток Dede CCL-39 посредством EMS (Sigma-Aldrich) в питательной среде до конечной концентрации 500 мкг/мл в течение 20 ч. NHE-дефицитные клетки отбирали путем культивирования в растворе LiCl (130 mM LiCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 5 mM глюкозы и 20 mM Hepes-Tris, pH 7,4) в течение 2 ч с последующим культивированием в растворе хлорида холина (130 mM хлорид холина, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂ и 20 mM 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота-Tris, pH 5,5) в течение 30 мин. Выжившие клетки после выращивания в стандартной культуральной среде до конfluence 90% подвергали второму циклу отбора. Колонии одного клона выделяли, выращивали до полной конfluence и подвергали третьему циклу отбора. Выжившие клоны размножали и тестировали на активность натрий-водородного обменника (см. анализ ниже).

кДНК, кодирующую человеческий NHE3 с тус-tag, субклонировали в плазмиду pcDNA3.1, и стабильную клеточную линию получали в вышеупомянутых NHE-дефицитных клетках NHD C8. Стабильно сверхэкспрессирующие клетки NHE3 поддерживали в среде Маккоя 5A (Hyclone-GE Healthcare Bio sci-

ence) с 10% ФБС, 400 мг/мл G418 (Gibco-ThermoFisher Scientific) и раствором антибиотика/антимикотика.

Для измерения активности NHE внутриклеточный pH клеток снижали путем добавления NH_4Cl . Натрийзависимое изменение внутриклеточного pH затем измеряли с помощью внутриклеточного pH-чувствительного флуоресцеинового красителя BCECF-AM (Molecular Probes-ThermoFisher Scientific). Клетки NHD8/NHE3 диспергировали с помощью многоканальной пипетки в 96-луночных планшетах с поли-D-лизинном (Corning) по 30000 на лунку. Клетки инкубировали при 37°C с добавлением 5% CO_2 в течение 24 ч. Среды для культивирования клеток откачивали, клетки промывали посредством 100 мкл раствора NaCl-HEPES (100 mM NaCl, 10 mM глюкозы, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0,1% БСА, 50 mM HEPES, pH 7) дважды, и затем клетки инкубировали с 100 мкл 5 мкМ BCECF-AM в растворе NH_4Cl /плюроник F-127/пробененид (130 mM NH_4Cl , 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0,1% БСА, 0,0625% плюроник F-127, 2 mM пробененид, 20 mM HEPES, pH 7) в течение 60 мин при комнатной температуре. После инкубации клетки промывали 100 мкл не содержащего аммония и натрия раствора HEPES/0,1% БСА (100 mM холина хлорида, 10 mM глюкозы, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0,1% БСА, 50 mM HEPES, pH 7) дважды. Затем в соответствующие лунки добавляли 86 мкл не содержащего аммония, не содержащего натрия, HEPES/0,1% БСА, содержащего 30 мкМ амилорида с соединением или контролями. Активность NHE инициировали добавлением 14 мкл 1 M NaCl для достижения конечной концентрации 140 mM. Планшет немедленно считывали на предмет интенсивности флуоресценции при длине волны возбуждения 505 нм и длине волны излучения 550 нм. Процент ингибирования при каждой тестируемой концентрации рассчитывали относительно активности NHE с 1% ДМСО в качестве 0% ингибирования и активности NHE с насыщающей концентрацией стандартного ингибитора в качестве 100% ингибирования. Кривая отклика по 9 концентрациям от 1000 нМ до 0,152 нМ плюс отсутствие соединения построена по 4-параметрической модели с применением Prism для определения IC_{50} .

Пример 2 ингибировал NHE3 человека зависимым от концентрации образом с IC_{50} , составляющей 5,76 нМ (среднее геометрическое индивидуальных IC_{50} , $n=7$ со стандартной ошибкой среднего геометрического 0,72). Пример 2 является селективным для NHE3, поскольку он не является сильнодействующим ингибитором NPT2b ($\text{IC}_{50}=58,4$ мМ) или SGLT1 ($\text{IC}_{50}=6,6$ мкМ). Пример 1 ингибирует NHE3 человека зависимым от концентрации образом с IC_{50} , составляющей 37,9 нМ (среднее геометрическое индивидуальных IC_{50} , $n=2$ со стандартной ошибкой среднего геометрического 6,2).

Влияние примера 2 на кровяное давление.

Самцов крыс со спонтанной гипертензией (SHR) массой 250-300 г в возрасте 7 недель акклиматизировали к обратному световому циклу (свет выключали в 8:00 и включали в 20:00) и кормили обычным кормом и водой ad libitum. Имплантируемые телеметрические устройства (модель TA11PA-C40, Data Sciences International) имплантировали в брюшную аорту. После восстановления после операции, крыс помещали в отдельные клетки в тихой телеметрической комнате для измерения кровяного давления (среднего артериального давления, САД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС). Оцифрованные сигналы давления регистрировали в течение 20 секунд каждые 5 минут с применением программного обеспечения DSI Dataquest IV 4.0.

31 крысу с SHR рандомизировали с помощью MAP в две группы и обрабатывали дважды в день в течение 14 дней носителем ($n=15$) (10% аравийской камеди, 0,05% пеногасителя в очищенной воде) или 0,15 мг/кг/день Примера 2. Первую дозу вводили между 6:00 и 6:30 (за 2 ч до выключения света), и вторую дозу - между 16:00 и 16:30. Также контролировали ежедневное потребление пищи и увеличение массы тела.

Данные MAP, ЧСС и массы тела (MT) анализировали с помощью анализа ковариации с повторными измерениями (ANCOVA) с исходным уровнем в качестве ковариаты. Данные о потреблении пищи (FC) анализировали с помощью дисперсионного анализа с повторными измерениями (ANOVA). Среднее кровяное давление за время исследования (дни 1-14) для группы, получавшей 0,15 мг/кг/день примера 2, составляло на 4,83 мм рт.ст. меньше, чем в контрольной группе, p -величиной 0,0007 (табл. 1). Не наблюдалось значительного влияния на ЧСС, MT или FC.

Таблица 1
Влияние примера 2 на среднее артериальное давление (САД)
у самцов крыс со спонтанной гипертензией (SHR)

Группа лечения	Среднее кровяное давление в течение 1-14 дней (мм рт. ст.)	СОС	Различие (мм рт. ст.)	p -величина
Носитель	158,16	0,85	4,83	0,0007
Пример 2 0,15 мг/кг/день.	153,33	0,97		

Влияние примера 1 на абсорбцию натрия.

Экскреция натрия с мочой после перорального болюсного дозирования хлорида натрия является косвенным показателем абсорбции натрия в кишечнике.

Самцов Sprague-Dawley с массой тела от 200 до 250 г рандомизировали в группы на основе равной средней массы тела. Далее следующий состав называется "1% НЕС": 1% гидроксипропилцеллюлозы (НЕС) и 0,25% Твин® 80 с пеногасителем в воде. Пример 1 при 0,1 мг/мл (конечная доза 1 мг/кг, дозированная в объеме 10 мл/кг) готовили с 1% НЕС в стеклянном флаконе, содержащем предварительно взвешенное количество соединения, а затем обрабатывали ультразвуком до получения однородной суспензии. Чтобы гарантировать, что соединение не прилипает к стенкам или дну флакона, во флакон добавляют мешалку для перемешивания, и суспензию перемешивают на протяжении всего процесса приготовления и дозирования. Последующие дозируемые растворы из примера 1 получали путем серийных разведений посредством 1% НЕС. NaCl в концентрации 10 мг/мл (конечная доза 200 мг/кг, дозированная в объеме 20 мл/кг) готовили путем добавления стерильной воды.

За день до исследования животных помещали в чистые клетки без еды, но с доступом к воде, на ночь. В день исследования крысам перорально вводили носитель или различные дозы примера 1. Через 30 мин животным вводили NaCl, а затем сразу перемещали в метаболические клетки. Образцы мочи собирали в течение 2 ч. Регистрировали чистый объем мочи. Натрий и креатинин в моче оценивали с помощью клинического биохимического анализатора.

Значения, выраженные как отношение натрия в моче к креатинину (мМ/мМ), рассчитывали и представили как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Кривые построены с помощью 4-параметрического инструмента построения логистической кривой GraphPad Prism 6 для расчета ED₅₀. С целью построения кривой доза примера 1 искусственно установлена в количестве 0,001 мг/кг в программном обеспечении для группы, получавшей только носитель.

После перорального введения примера 1 и болюсного введения NaCl экскреция натрия с мочой снижается дозозависимым образом (табл. 2). ED₅₀ примера 1 на экскрецию натрия с мочой составляет 0,058 мг/кг. Дозозависимое снижение экскреции натрия с мочой согласуется с дозозависимым ингибированием абсорбции натрия в кишечнике в примере 1.

Таблица 2

Влияние примера 1 на содержание натрия в моче у крыс

Лечение	Отношение натрия к креатинину в моче (мМ/мМ, Средние значения \pm СОС)
Носитель (n = 8)	1,43 \pm 0,16
Пример 1, 0,03 мг/кг (n = 5)	1,19 \pm 0,19
Пример 1, 0,1 мг/кг (n = 5)	0,80 \pm 0,23
Пример 1, 0,3 мг/кг (n = 5)	0,37 \pm 0,06
Пример 1, 1,0 мг/кг (n = 5)	0,63 \pm 0,23

Влияние примера 2 на абсорбцию натрия и фосфата.

Экскреция натрия и фосфата с мочой после перорального болюсного дозирования фосфата натрия является косвенным показателем абсорбции натрия и фосфата в кишечнике.

Самцов крыс Sprague-Dawley в возрасте примерно 7 недель с массой тела от 195 до 221 г рандомизировали в группы на основе равной средней массы тела. Пример 2 при 0,3 мг/мл (конечная доза 3 мг/кг, дозированная в объеме 10 мл/кг) готовили путем добавления 1% НЕС в стеклянный флакон, содержащий предварительно взвешенное количество соединения, а затем обрабатывали ультразвуком до возникновения однородной суспензии. Чтобы гарантировать, что соединение не прилипает к стенкам или дну флакона, во флакон добавляют мешалку для перемешивания, и суспензию перемешивают на протяжении всего процесса приготовления и дозирования. Последующие дозируемые растворы из примера 2 получали и путем серийных разведений посредством 1% НЕС. NaH₂PO₄ в концентрации 34,5 мг/мл (конечная доза 690 мг/кг, дозированная в объеме 20 мл/кг) готовили путем добавления стерильной воды.

В день исследования животных помещали в чистые клетки без еды, но с доступом к воде, на 4 ч голодания перед исследованием. Крысам перорально вводили носитель или различные дозы примера 2. Через 15 мин животным вводили стерильную воду или NaH₂PO₄, а затем немедленно перемещали в метаболические клетки. Образцы мочи собирали в течение 4 ч. Регистрировали чистый объем мочи. Натрий, креатинин и фосфаты в моче оценивали с помощью клинического биохимического анализатора. Значения, выраженные как соотношение содержания в моче к содержанию в моче фосфора или натрия, рассчитывали и представили как среднее значение \pm СОС. Кривые построены с помощью 4-параметрического инструмента построения логистической кривой GraphPod Prism 6 для расчета ED₅₀. С целью построения кривой доза примера 2 искусственно установлена в количестве 0,00001 мг/кг в программном обеспечении для группы, получавшей только носитель.

После перорального введения примера 2 и болюсного введения фосфата экскреция натрия и фосфата с мочой снижается дозозависимым образом (табл. 3). ED₅₀ примера 2 на экскрецию фосфора с мочой составляет 0,041 мг/кг, а ED₅₀ примера 2 на экскрецию натрия составляет 0,058 мг/кг. Дозозависимое снижение экскреции натрия и фосфата с мочой согласуется с дозозависимым ингибированием абсорбции

натрия и фосфата в кишечнике в примере 2.

Таблица 3

Влияние примера 2 на фосфор и натрий в моче у крыс

Обработка	Отношение содержания в моче к содержанию в пище фосфора (средние значения \pm СОС)	Отношение содержания в моче к содержанию в пище натрия (средние значения \pm СОС)
Носитель	0,297 \pm 0,039	0,271 \pm 0,031
Пример 2, 0,001 мг/кг	0,337 \pm 0,017	0,326 \pm 0,042
Пример 2, 0,003 мг/кг	0,350 \pm 0,023	0,413 \pm 0,055
Пример 2, 0,01 мг/кг	0,320 \pm 0,042	0,290 \pm 0,06
Пример 2 0,03 мг/кг	0,268 \pm 0,04	0,276 \pm 0,06
Пример 2, 0,1 мг/кг	0,197 \pm 0,045	0,105 \pm 0,042
Пример 2, 0,3 мг/кг	0,168 \pm 0,027	0,039 \pm 0,010
Пример 2, 1 мг/кг	0,191 \pm 0,039	0,051 \pm 0,027
Пример 2, 3 мг/кг	0,144 \pm 0,009	0,022 \pm 0,009

Влияние примера 2 в комбинации с ингибитором NPT2b (соединение А) на абсорбцию фосфата у крыс

Дозируемые растворы ингибитора NPT2b: соединение А и сополимер поли-1-винилпирролидон-винилацетата (PVP-VA, Sigma-Aldrich) взвешивали во флакон при соотношении 30% соединения А и 70% PVP-VA по массе. Прозрачный желтый раствор получали разбавлением смеси в MeOH с последующим добавлением 2 моль NaOH на моль соединения А с применением 5 н. NaOH. Раствор сушили распылением в потоке горячего азота, и порошок твердой дисперсии собирали, а затем сушили в вакуумной печи. Дозы для распыленной высушенной твердой дисперсии (SDD) везде называются активным фармацевтическим ингредиентом (API).

Для получения дозируемого раствора соединения А соответствующее количество SDD соединения А взвешивали во флаконе и растворяли в воде (дозированный объем 10 мл/кг). Чтобы гарантировать, что соединение не прилипает к стенкам или дну флакона, во флакон добавляли мешалку для перемешивания, и суспензию перемешивали на протяжении всего процесса приготовления и дозирования. Последующие растворы с более низкими дозами получали путем серийных разведений водой. PVP-VA в концентрации 7 мг/мл применяли в качестве контроля носителя.

Дозируемые растворы ингибитора NHE3: Чтобы приготовить дозируемый раствор примера 2, соответствующее количество соединения взвешивали во флаконе и растворяли в 1% НЕС (объем дозирования 10 мл/кг). Чтобы гарантировать, что соединение не прилипает к стенкам или дну флакона, во флакон добавляли мешалку для перемешивания, и суспензию перемешивали на протяжении всего процесса приготовления и дозирования. Последующие растворы с более низкими дозами получали путем серийных разведений посредством НЕС.

Для получения дозируемого раствора фосфата с радиоактивной меткой получали раствор 16,25 мМ NaH_2PO_4 , 0,9% физиологического раствора, pH 7,4, и фильтровали его, используя стерильный полиэфир-сульфоновый фильтр с размером пор 0,22 мкм, Millex -GP (EMD Millipore). Радиоактивный фосфат ($\text{H}_3^{33}\text{PO}_4$, Perkin Elmer) добавляли в концентрации примерно 2,5 мКи на мл раствора и снова фильтровали.

Осуществляли три отдельных исследования. В этих исследованиях самцов крыс Sprague Dawley рандомизировали в группы с примерно равной средней массой тела. После голодания в течение ночи, всем животным вводили дозу 10 мл/кг любого носителя, различные дозы соединения А (исследование 1), различные дозы примера 2 (исследование 2) или 1,2 мг/кг соединения А и различные дозы примера 2 (исследование 3). Через 15 мин перорально вводили радиоактивно меченый фосфат в объеме 2 мл. Через 15 мин собирали кровь и получали плазму. Радиоактивность (dpm) в 50 мкл плазмы измеряли путем счета сцинтилляций и применяли для расчета абсорбции фосфата. Результаты нормализовали по контрольным носителям, представляющим 100% абсорбцию. Кривые построены с помощью нелинейной регрессии с переменным наклоном с применением GraphPad Prism 6 для расчета ED_{50} и E_{max} , приведенных в табл. 7. Для построения кривой при расчете ED_{50} доза примера 2 искусственно установлена в количестве 0,00001 мг/кг в программном обеспечении для группы, получавшей только носитель в исследовании 2, а также для группы, получавшей носитель + 1,2 мг/кг соединения А в исследовании 3. Построение кривой для одного Соединения А в Исследовании 1 не проводили.

Результаты трех отдельных исследований, осуществленных на крысах, исследования доза-ответ для соединения А (исследование 1), исследования доза-ответ для примера 2 (исследование 2) и исследования

доза-ответ для примера 2 в присутствии 1,2 мг/кг соединения А (исследование 3), представлено в табл. 4-7 ниже. И пример 2, и соединение А ингибировали абсорбцию фосфата дозозависимым образом с процентным ингибированием при самой высокой испытанной дозе 37% и 18% соответственно. Однако при введении в комбинации 70% ингибирование достигалось при наивысшей дозе примера 2 в комбинации с 1,2 мг/кг соединения А. Таким образом, два соединения были более эффективными при совместном введении, чем при отдельном введении любого соединения, что согласуется с тем, что каждое соединение ингибирует различные пути, способствующие абсорбции фосфатов в кишечнике у крыс.

Таблица 4

Влияние соединения А на абсорбцию фосфата у крыс (исследование 1)

Обработка	Поглощение (по сравнению с контролем-носителем, %, среднее значение \pm СОС)
Носитель	100 \pm 7,23
Соединение А, 0,01 мг/кг	94,39 \pm 7,88
Соединение А, 0,1 мг/кг	87,61 \pm 6,08
Соединение А, 1 мг/кг	87,64 \pm 7,26
Соединение А, 10 мг/кг	81,53 \pm 5,50

Таблица 5

Влияние примера 2 на абсорбцию фосфата у крыс (исследование 2)

Обработка	Поглощение (по сравнению с контролем-носителем, %, среднее значение \pm СОС)
Носитель	100,00 \pm 14,22
Пример 2, 0,001 мг/кг	97,16 \pm 20,76
Пример 2, 0,003 мг/кг	100,81 \pm 20,74
Пример 2, 0,01 мг/кг	75,15 \pm 15,52
Пример 2 0,03 мг/кг	83,17 \pm 17,99
Пример 2, 0,1 мг/кг	57,29 \pm 11,20
Пример 2, 0,3 мг/кг	71,09 \pm 13,98
Пример 2, 1 мг/кг	44,29 \pm 9,09
Пример 2, 3 мг/кг	60,04 \pm 12,00
Пример 2, 10 мг/кг.	63,47 \pm 8,39

Таблица 6

Влияние соединения А и примера 2 в комбинации на абсорбцию фосфата у крыс (исследование 3)

Обработка	Поглощение (по сравнению с контролем-носителем, %, среднее значение \pm СОС)
Носитель + Соединение А, 1,2 мг/кг	71,00 \pm 11,63
Пример 2, 0,001 мг/кг + Соединение А, 1,2 мг/кг	85,61 \pm 5,16
Пример 2, 0,003 мг/кг + Соединение А, 1,2 мг/кг	70,98 \pm 7,27
Пример 2, 0,01 мг/кг + Соединение А, 1,2 мг/кг	73,53 \pm 7,29
Пример 2, 0,03 мг/кг + Соединение А, 1,2 мг/кг	61,82 \pm 6,73
Пример 2, 0,1 мг/кг + Соединение А, 1,2 мг/кг	44,78 \pm 6,09
Пример 2, 0,3 мг/кг + Соединение А, 1,2 мг/кг	35,56 \pm 2,86
Пример 2, 1 мг/кг + Соединение А, 1,2 мг/кг	35,52 \pm 8,67
Пример 2, 3 мг/кг + Соединение А, 1,2 мг/кг	26,94 \pm 4,94
Пример 2, 10 мг/кг + Соединение А, 1,2 мг/кг	29,83 \pm 3,72

Таблица 7

	Соединение А	Пример 2	Пример 2 + 1,2 мг/кг Соединения А
ED ₅₀ (мг/кг)	Без построения кривой	0,041	0,056
% Ингибирования при наивысшей дозе	18%	37%	70%

Влияние примера 2 в комбинации с ингибитором NPT2b (соединение А) на абсорбцию фосфата и удержание фосфата в кишечнике у крыс.

Целью данного исследования является изучение на крысах влияния примера 2, соединения А и комбинации примера 2/соединение А на абсорбцию фосфата через 15 мин после дозирования соединений и фосфата, остающегося в кишечнике через 4,25 ч после дозирования соединений. Последний показатель является мерой пероральной нагрузки фосфата, который абсорбируется в течение длительного периода времени.

В этом исследовании применяли два носителя: 1) 1% НЕС и 2) 0,46% сополимера поли-1-винилпирролидон-винилацетата в воде (носитель PVP-VA). Контрольная группа, получавшая носитель, в данном исследовании получала комбинацию 1:1 двух носителей.

Дозируемые растворы примера 2, соединения А и фосфата получали аналогично описанному выше, за исключением того, что дозы составляли 0,4 мг/кг для примера 2 и 10 мг/кг для соединения А, и их получали в концентрации, при которой они будут дозироваться в 5 мл/кг объема. Для групп, получавших только пример 2 и соединение А, их смешивали в соотношении 1:1 с носителем другого соединения, в то время как соединение А и пример 2 смешивали в соотношении 1:1 перед дозированием. Конечный объем дозирования во всех случаях составлял 10 мл/кг.

Самцам крыс Sprague Dawley обеспечивали голодание в течение 4 ч, а затем вводили соответствующие носители, 10 мг/кг соединения А, 0,4 мг/кг примера 2 или комбинацию обоих соединений. Через 15 мин животным вводили раствор фосфата с радиоактивной меткой. Через 15 мин собирали кровь и получали плазму. Радиоактивность в плазме измеряли путем счета сцинтилляций и применяли для расчета ингибирования абсорбции фосфата. Хотя пример 2 (0,4 мг/кг) ингибирует абсорбцию фосфата на 29%

($P=0,046$ по сравнению с контролем-носителем), а соединение А (10 мг/кг) ингибирует абсорбцию фосфата на 35% ($P=0,013$ по сравнению с контролем-носителем), комбинация двух соединений ингибирует абсорбцию фосфата на 63% ($P=0,0001$ по сравнению с контролем-носителем). 63% ингибирование комбинацией примера 2/соединения А превышает ингибирование любым соединением по отдельности. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего с числом животных, равным 8, для групп. Статистическую значимость определяли с помощью ANOVA со сравнением Даннета с комбинацией пример 2/соединение А с применением JMP 12.1.

Через 4 ч после дозирования раствора фосфата, меченного радиоактивной меткой, желудок, тонкий кишечник, толстый кишечник и фекалии собирали, взвешивали и расщепляли 1 н. NaOH в течение ночи при 37°C. Радиоактивность в каждой фракции измеряли с применением счёта сцинтилляций.

Процентную дозу, извлеченную в желудочно-кишечном тракте, определяли как радиоактивность, извлеченную в желудке, тонком кишечнике, толстом кишечнике и кале, по сравнению с дозированным количеством. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего с числом животных, равным 8, для групп. Статистическую значимость определяли с помощью ANOVA со сравнением Даннета с комбинацией пример 2/соединение А с применением JMP 12.1.

Таблица 8

Процент извлеченной дозы в каждом отделе желудочно-кишечного тракта					
Обработка	Желудок	Тонкий кишечник	Толстый кишечник	Кал	Всего
Контроль, PVP + НЕС	5,50 \pm 0,89	8,03 \pm 0,54	11,83 \pm 1,09	<0,1	25,36 \pm 1,27
Пример 2, 0,4 мг/кг	3,9 \pm 0,49	8,64 \pm 0,32	18,16 \pm 2,58	<0,1	30,7 \pm 2,43
Соединение А, 10 мг/кг	4,86 \pm 1,13	8,98 \pm 0,48	18,43 \pm 2,03	<0,1	32,27 \pm 1,38
Пример 2 + Соединение А	6,23 \pm 0,80	10,76 \pm 0,67	28,98 \pm 1,93	<0,1	45,96 \pm 1,33

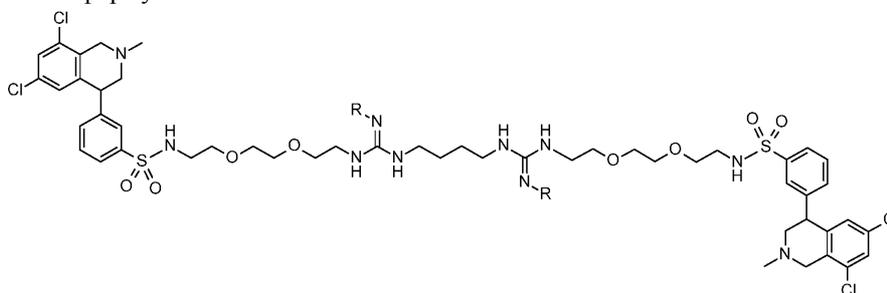
Процент дозы фосфата с радиоактивной меткой, извлеченного из каждого отдела желудочно-кишечного тракта, среднее значение \pm СОС.

Общая извлеченная радиоактивность выше у животных, которым вводили дозу как примера 2, так и соединения А (46%), чем при дозировании одного из них (31% и 32%, соответственно) (табл. 8). Таким образом, комбинация является более эффективной, чем любое соединение по отдельности.

Данные извлеченного процента дозы в желудочно-кишечном тракте далее анализировали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA в JMP 12.1 для проверки аддитивности эффектов примера 2 и соединения А в отношении ингибирования абсорбции фосфата. Эксперимент взаимодействия примера 2/соединения А является значимым ($p=0,0187$), что указывает на синергетическую взаимосвязь между соединениями в дозах, испытанных в этом исследовании. Это означает, что ингибирующий эффект комбинации больше, чем сумма эффектов отдельных соединений.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

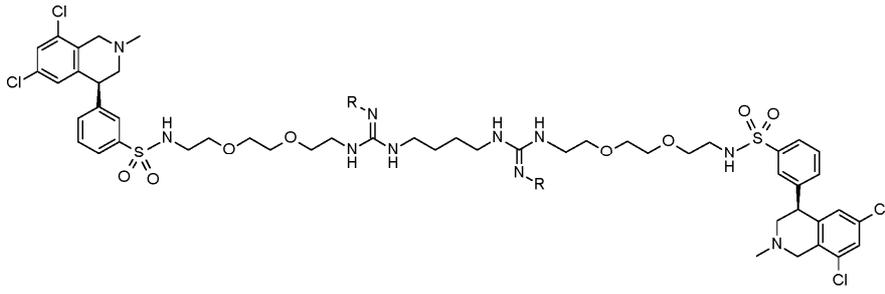
1. Соединение формулы:



где оба R представляют собой CN, или оба R представляют собой C(O)NH₂, или его фармацевтически приемлемая соль.

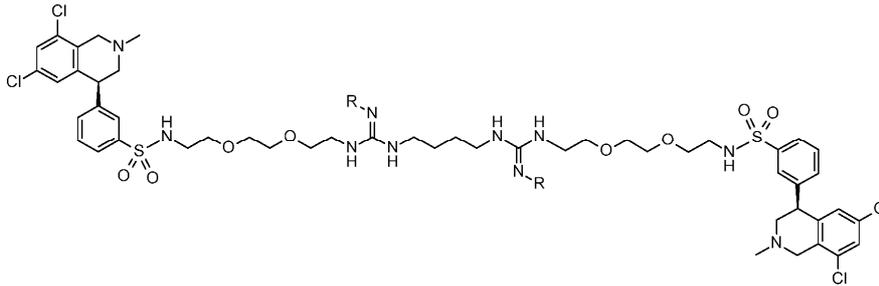
2. Соединение по п.1, отличающееся тем, что оба R представляют собой C(O)NH₂, или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Соединение по п.1 или 2, отличающееся тем, что соединение представляет собой:

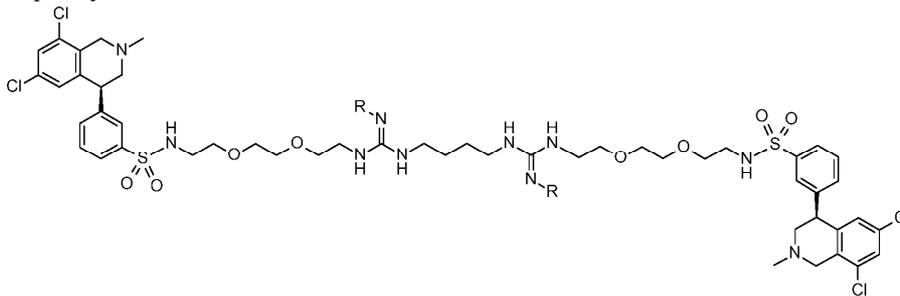


или его фармацевтически приемлемая соль.

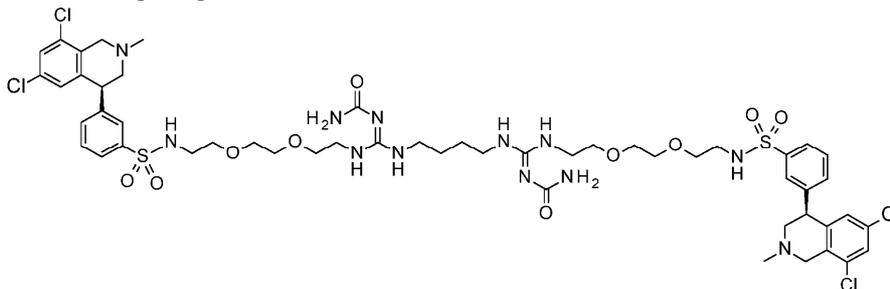
4. Соединение по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что указанное соединение представляет собой:



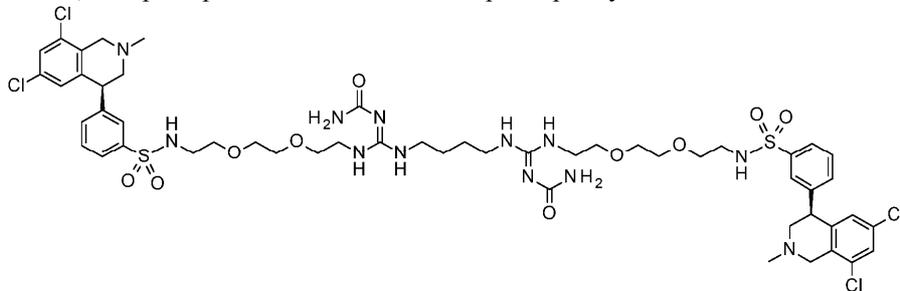
5. Соединение по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что указанное соединение представляет собой дигидрохлоридную соль:



6. Соединение, которое представляет собой:



7. Соединение, которое представляет собой дигидрохлоридную соль:



8. Способ лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из хронической болезни почек, гиперфосфатемии, вторичного гиперпаратиреоза, сердечной недостаточности, гипертонии и сердечно-сосудистого заболевания, включающий введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-7, или его фармацевтически приемлемой соли.

9. Способ лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из хронической болезни почек,

