

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **032955**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.08.30

(21) Номер заявки
201891262

(22) Дата подачи заявки
2014.11.12

(51) Int. Cl. *A61K 31/45* (2006.01)
A61K 31/454 (2006.01)
C07D 211/88 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ПРОИЗВОДНОГО ГЛУТАРИМИДА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЭОЗИНОФИЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) **2013150861**

(32) **2013.11.14**

(33) **RU**

(43) **2018.10.31**

(62) **201690798; 2014.11.12**

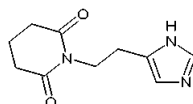
(56) **WO-A1-1994024133**
WO-A1-2007000246
RU-C2-2406727
RU-C2-2378284

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ХЕМИМБЬОН
ТЕРАПЬЮТИКС" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Небольсин Владимир Евгеньевич,
Кромова Татьяна Александровна,
Рыдловская Анастасия
Владимировна, Чучалин Александр
Григорьевич (RU)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к способу лечения эозинофильных заболеваний, включающему введение пациенту эффективного количества соединения



или его фармацевтически приемлемой соли, или его применения по тому же назначению, где эозинофильное заболевание представляет собой бронхиальную астму, аллергический ринит, полипозные риносинусопатии, эозинофильный колит, эозинофильный синдром, аллергический конъюнктивит, атопический дерматит, синдром Черджа-Стросса, анафилактический шок, отек Квинке, эозинофильный васкулит, эозинофильный эзофагит, эозинофильный гастроэнтерит или фиброзы.

B1**032955****032955****B1**

Изобретение относится к применению биологически активных соединений производных глутаримидов или их фармацевтически приемлемых солей в качестве средств для лечения эозинофильных заболеваний.

Уровень техники

Эозинофилы - клетки врожденного иммунитета. Они вырабатываются в костном мозге и преимущественно циркулируют в крови. Главная эффекторная функция эозинофилов - немедленное высвобождение цитоплазматических гранул в ответ на активацию различными стимулами. Цитоплазматические гранулы содержат провоспалительные медиаторы: цитокины, хемокины, липид- и нейромедиаторы, факторы роста и катионные белки. Катионные белки эозинофилов включают 4 класса: большой основной белок (MBP), эозинофильная пероксидаза (EPO), эозинофильный катионный белок (ECP) и эозинофил-зависимый нейротоксин (EDN). В совокупности эти белки оказывают цитотоксическое действие как по отношению к инфекционным микроорганизмам, так и по отношению к тканям хозяина, вызывая эозинофильное воспаление [Hogan S.P., Rosenberg H.F., Moqbel R., et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease//Clin Exp Allergy. 2008;38 (5):709-50].

В норме количество эозинофилов в крови составляет $0,02-0,3 \cdot 10^9/\text{л}$ или 0,5-5% от всех лейкоцитов. Увеличение числа эозинофилов в крови по сравнению с нормой - эозинофилия. Гиперэозинофилией, или большой эозинофилией, называют состояния, при которых содержание эозинофилов в крови составляет 15% и более, обычно при увеличении общего числа лейкоцитов [Hoffman R., Benz Jr. E.J., Shattil S.J., et al., eds. Hematology: Basic Principles and Practice. 4th ed. Philadelphia, Pa: Churchill Livingstone; 2005:768].

Повышение количества эозинофилов в крови и тканях сопровождается различными по этиологии и патогенезу заболеваниями. Среди них паразитарные инвазии, широкий спектр аллергических состояний, включая астму, ринит, носовые полипы, эозинофильный колит, эозинофильные синдромы, аллергический конъюнктивит и атопический дерматит, ревматические болезни (ревматоидный артрит, диффузный эозинофильный фасциит, синдром Черджа-Стросса, узелковый периартериит), а также патологии неясной этиологии (эозинофильный эзофагит, эозинофильный гастроэнтерит) [Blanchard C., Rothenberg M.E. Biology of the eosinophil//Adv Immunol. 2009; 101:81-121].

Среди аллергических заболеваний наиболее важной с медицинской точки зрения считается бронхиальная астма, хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, характеризующееся эпизодической обструкцией потока воздуха, воспалением дыхательных путей и повышенной бронхиальной реактивностью на неспецифичные аллергены.

Существует большое количество доказательств, что эозинофилы являются ключевым компонентом аллергического ответа при астме. Секретируемые тучными клетками IL-3, IL-5 способствуют аккумуляции эозинофилов в легкие, последующей активации этих клеток с выделением LTC₄, эозинофильного катионного протеина, главного основного протеина, нейротоксина, эозинофильной пероксидазы (EPO), трансформирующего росткового фактора, свободных радикалов [Blanchard C., Rothenberg M.E. Biology of the eosinophil//Adv Immunol. 2009; 101:81-121].

Выявляется прямая корреляционная зависимость между активностью воспалительного процесса при бронхиальной астме и содержанием эозинофильного катионного протеина в сыворотке крови [Bjornsson E., Janson C., Hakansson L. et al. Serum eosinophil cationic protein in relation to bronchial asthma in young Swedish population. Allergy 1994; vol. 49: 400-407]. В лаважной жидкости бронхов у больных бронхиальной астмой выявляется увеличение количества эозинофилов. На поверхности эозинофилов имеются низкоаффинные рецепторы для IgE, в связи с этим эозинофилы могут непосредственно активироваться причинно-значимыми аллергенами. На поверхности эозинофилов выявлены также рецепторы к IL-2, IL-3, IL-5, GM-CSF, PAF, простагландинам. Через эти рецепторы указанные цитокины и липидные медиаторы способны индуцировать активацию эозинофилов и высвобождение ими медиаторов (LTC₄, PAF) и цитокинов (IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, GM-CSF, TGFβ). Возникающая под воздействием эозинофильных белков деструкция эпителия дыхательных путей способствует развитию бронхиальной гиперреактивности, снижению барьерной функции слизистой оболочки дыхательных путей.

Большое внимание сейчас уделяется возможной роли эозинофилов в восстановлении и ремоделировании ткани, так как обнаружена четкая связь между эозинофилией в тканях и некоторыми фиброзными заболеваниями (эндомиокардиальным фиброзом печени у больных гиперэозинофильным синдромом, узловым склерозирующим вариантом болезни Ходжкина, фиброзом под базальной мембраной при бронхиальной астме) [Noguchi H. et al. Tissue eosinophilia and eosinophil degranulation in syndromes associated with fibrosis//Am. J. Pathol. 1992, vol. 140. p. 521-528].

Эозинофилы - источник нескольких фиброгенных и ростовых факторов, среди которых трансформирующий фактор-β (TGF-β), фактор роста фибробластов (FGF)-2, эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF), матриксные металлопротеиназы (MMP)-9, IL-1β, IL-13 и IL-17. Клинические испытания анти-IL-5 антител также подтвердили роль эозинофилов в событиях, связанных с отложением определенных матриксных белков в ретикулярной базальной мембране [Kay A.B., Phipps S., Robinson D.S. A role for eosinophils in airway remodeling in asthma//Trends Immunol. 2004, vol. 25, p. 477-82].

В настоящее время самым распространенным способом лечения астмы является применение корти-

костероидов (будесонид, беклометазон дипропионат, флутиказона пропионат, мометазона фураат) путем ингаляции. Однако кортикостероиды функционируют, индуцируя общее иммуносупрессирующее действие, и имеют место неблагоприятные побочные эффекты, связанные с их длительным применением, включая высокое кровяное давление, остеопороз и развитие катаракт [Barnes P.J. New drugs for asthma//Semin Respir Crit Care Med. 2012; 33(6):685-94]. Кортикостероиды необходимо принимать каждый день, и поэтому соблюдение этого требования пациентом является другой проблемой для успешного применения указанных лекарственных средств. Кроме того, существуют пациенты, не восприимчивые к применению кортикостероидов, которым требуется применение альтернативной терапии.

Избирательная направленность на мишень - эозинофилы может преодолеть неблагоприятные эффекты использования общих иммуносупрессорных средств плеiotропного действия.

В настоящее время проводятся клинические испытания препаратов, направленных на снижение эозинофилии за счет ингибирования взаимодействия интерлейкина-5 с рецептором IL-5R α , расположенным на поверхности эозинофила. К таким препаратам относятся гуманизированные моноклональные антитела (мАт) против IL-5 и конкурентные ингибиторы IL-5R α .

Среди нейтрализующих IL-5 моноклональных антител наиболее эффективными можно назвать SB240563 (меполизумаб, Glaxo Smith Kline). По данным [Nair P., Pizzichini M.M.M., Kjarsgaard M., et al. Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputum eosinophilia. NEJM. 2009; 360:985-93] терапия меполизумабом преднизолонзависимых астматиков снизила эозинофилию в крови и мокроте и, главное, улучшила состояние пациентов, снизив количество эпизодов обострения и дозу преднизолона. В другом исследовании применение анти-IL-5 антител (меполизумабома) пациентами с кортикостероид-нечувствительной астмой также привело к снижению частоты эпизодов обострения и улучшило самочувствие по опроснику AQLQ. Помимо влияния на астму в этом испытании дополнительно было зарегистрировано терапевтическое действие в отношении полипозной ринусиносопатии [Haldar P., Brightling C.E., Hargadon B., et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. NEJM. 2009; 360:973-84].

В независимом испытании на взрослых пациентах с полипозной ринусиносопатией меполизумаб значительно снижал содержание ЕСР и растворимой формы IL-5R α в крови, а также концентрацию IL-5R α , IL-6 и IL-1b в носу, что коррелировало с облегчением течения заболевания по общей шкале полипов (total polip score) [Gevaert P., Van Bruaene N., Cattaert T., et al. Mepolizumab, a humanized anti-IL-5 mAb, as a treatment option for severe nasal polyposis. J Allergy Clin Immunol. 2011; 128(5):989-995].

Использование анти-IL-5 антител не ограничивается бронхиальной астмой и полипозной ринусиносопатией. Данная терапия эффективна и при других эозинофилопосредованных заболеваниях. Например, у пациентов с гиперэозинофильным синдромом терапия меполизумабом снизила эозинофилию крови и позволила сократить дозу принимаемого преднизолона [Rothenberg M.E., Klion A.D., Roufosse F.E., et al. Treatment of patients with the hypereosinophilic syndrome with mepolizumab. NEJM. 2008; 358 (12):1215-28]. У пациентов с эозинофильным эзофагитом на фоне терапии анти-IL-5 антителами наблюдалось улучшение клинической картины, связанное со снижением дисфагии, наблюдалось 6-кратное снижение уровня эозинофилов в крови, и у некоторых пациентов была снижена гиперплазия эпителия пищевода [Stein M.L., Collins M.H., Villanueva J.M., et al. Anti-IL-5 (mepolizumab) therapy for eosinophilic esophagitis. J Allergy Clin Immunol. 2006;118(6):1312-9]. В клиническом испытании препарата на детях показано, что пациенты, в крови которых не более 20 эозинофилов в одном поле зрения микроскопа, имели улучшение по показателям: покраснение, хрупкость, борозды и вертикальные линии пищевода [Assa'ad A.H., Gupta S.K., Collins M.H., et al. An antibody against IL-5 reduces numbers of esophageal intraepithelial eosinophils in children with eosinophilic esophagitis. Gastroenterology. 2011; 141 (5):1593-604].

Также меполизумаб успешно применяется в качестве терапии эозинофильного васкулита [Kahn J.E., Grandpeix-Guyodo C., Marroun I., et al. Sustained response to mepolizumab in refractory Churg-Strauss syndrome. J Allergy Clin Immunol. 2010; 125:267-70]. Ежемесячное введение меполизумаба 28-летней женщине снизило содержание эозинофилов в крови до нормального уровня, предотвратило формирование кортикостероидной астмы и по данным рентгенограммы улучшило состояние легочной паренхимы [Kim S., Marigowda G., Oren E., Israel E., Wechsler M. Mepolizumab as a steroid-sparing treatment option in patients with Churg-Strauss syndrome. J Allergy Clin Immunol. 2010; 125:1336-43]. При проведении клинических испытаний у пациентов с эозинофильным васкулитом и выраженной эозинофилией терапия меполизумабом позволила снизить дозу кортикостероидов. Также была снижена эозинофилия, но после прекращения исследования обострения повторились [Oldhoff J.M., Darsow U., Werfel T., et al. Anti-IL-5 recombinant humanized monoclonal antibody (mepolizumab) for the treatment of atopic dermatitis. Allergy. 2005; 60 (5):693-6].

По данным [Amini-Vaughan Z.J., Martinez-Moczygemba M., Huston D.P. Therapeutic strategies for harnessing human eosinophils in allergic inflammation, hypereosinophilic disorders, and cancer//Curr Allergy Asthma Rep. 2012, vol. 12, № 5, p. 402-412] меполизумаб находится на второй стадии клинических испытаний для терапии астмы, эозинофильного эзофагита взрослых, эозинофильного эзофагита детей, эозинофильного васкулита и полипозных ринусиносопатий и на третьей стадии клинических испытаний в

качестве лечения гиперэозинофильного синдрома, эозинофильного эзофагита детей, астмы, индуцированной риновирусом, и хронического обструктивного бронхита. Другой препарат, реслизумаб (Cephalon), также являющийся гуманизированными моноклональными антителами SCH55700 к IL-5, проходит вторую стадию клинических испытаний в качестве терапии гиперэозинофильного синдрома и ларингита и третью стадию - в качестве терапии астмы и эозинофильного эзофагита детей. Все это позволяет заключить, что избирательная терапия, направленная на снижение эозинофилии - перспективное направление в лечении заболеваний, опосредованных данным типом клеток (бронхиальной астмы, аллергического ринита, аллергического конъюнктивита, атопического дерматита, полипозной риносинусопатии, эозинофильного эзофагита, эозинофильного васкулита, гиперэозинофильного синдрома).

Однако терапия с помощью мАТ влечет за собой несколько недостатков. Моноклональные антитела являются дорогими терапевтическими средствами, которые необходимо принимать в течение месяца или двух месяцев. Важным фактором является проблема несоблюдения предписаний пациентами, которая возникает из-за многократных визитов к врачу для введения инъекционного лекарственного средства. Кроме того, отклонения в аллотипах между пациентом и терапевтическим антителом может привести к тому, что терапия моноклональным антителом в конечном итоге станет неэффективной. Высокая доза мАТ и возможность образования иммунных комплексов также могут снижать эффективность пассивной иммунизации.

Другие способы, обеспечивающие терапевтические средства против патологических состояний, характеризующихся эозинофилией, описаны в WO 97/45448 и WO 03/040164. В заявке WO 97/45448 предложено применение "модифицированных и вариантных форм молекул IL5, способных антагонизировать активность IL5" для улучшения, ослабления или уменьшения другим образом отклоняющихся от нормы эффектов, вызванных нативными и мутантными формами IL5. Сообщается, что антагонизирующее действие является результатом вариантных форм IL5, связывающихся с низкоаффинной цепью IL5R, но не с высокоаффинными рецепторами. Действуя таким образом, варианты конкурируют с IL5 за связывание с его рецепторами, не влияя на физиологические действия IL5.

В заявке WO 03/040164 предложена композиция для вакцинации, направленной на эндогенное формирование антител к IL-5, IL-13 и эотаксину, т.е. к ключевым факторам созревания, активации, локализации и жизнеспособности эозинофилов. Композиция содержит вирусоподобную частицу и по меньшей мере один связанный с ней белок или пептид IL-5, IL-13 или человеческого эотаксина. Согласно изобретению данная композиция применима для получения вакцин, используемых для лечения аллергических заболеваний с эозинофильным компонентом и в качестве фармацевтической вакцины для профилактики или лечения аллергических заболеваний с эозинофильным компонентом.

В заявке № 8501176 предложено использование антител, связывающих IL-5R. Данные антитела включают участок, специфически связывающийся с рецептором IL-5 (IL-5R) и Fc-фрагмент. Изобретенный способ снижает количество эозинофилов в крови, в костном мозге, желудочно-кишечном тракте (например, пищеводе, желудке, тонкой и толстой кишки) или в легких и за счет этого сокращает клинические проявления астмы и хронического обструктивного бронхита легких у людей (<http://www.patentgenius.com/patent/8501176.html>).

В статье Yong Sup Lee et al., Studies on the site-selective N-acyliminium ion cyclization: synthesis of (±) - glochidine and (±) - glochidicine. Heterocycles, vol 37, № 1, 1994 раскрыто получение сукцинимидов гистамина сплавлением дигидрохлорида гистамина и янтарного ангидрида при нагревании исходных реагентов до 200-230°C в течение 40 мин.

В публикации международной заявки WO 2007/007054 раскрыты производные сукцинимидов и глутаримидов общей формулы (I), обладающие действием, ингибирующим метилирование ДНК в клетках, в частности опухолевых клетках. Раскрытые в данной публикации соединения получают реакцией сочетания аминопроизводного соединения, содержащего углеводородную цепь, с соответствующим ангидридом или кислотой или эфиром с последующим, если необходимо, закрытием кольца, необязательно в присутствии основания.

Описанные способы синтеза имидов глутаровой кислоты заключаются в нагревании дикарбоновой кислоты или ее производного, такого как ангидрид, диэфир и др., с первичным амином или его амидом (термическая циклизация) [Вейганд-Хильгетаг. Методы эксперимента в органической химии. Под ред. проф. Н. Н. Суворова. М., Химия, 1968, с. 446], циклизации моноамидов соответствующих дикарбоновых кислот с использованием водоотнимающего средства в качестве реагента, активирующего карбоксильную группу, такого как уксусный ангидрид [Shimotori et al., Asymmetric synthesis of 5-lactones with lipase catalyst. Flavour and Fragrance Journal, 2007, v. 22, № 6, p. 531-539], ацетилхлорид [Ito et al.; Chemoselective Hydrogenation of Imides Catalyzed by CpRu(PN) Complexes and Its Application to the Asymmetric Synthesis of Paroxetine//Journal of the American Chemical Society, 2007, v. 129, № 2, p. 290, 291], карбонилдимидазол [Polniaszek, et al.; Stereoselective nucleophilic additions to the carbon-nitrogen double bond. 3. Chiral acyliminium ions//Journal of Organic Chemistry, 1990, v. 55, № 1, p. 215-223], глутаровый или янтарный ангидриды [Ainhua Ardeo et al., A practical approach to the fused β-carboline system. Asymmetric synthesis of indolo [2,3-α] indolizidinones via a diastereoselective intramolecular α-amidoalkylation reaction/Tetrahedron

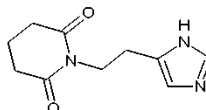
Letters, 2003, 44, 8445-8448].

В международной публикации патентной заявки WO 2007/000246 описан способ синтеза глутаримидов алкилированием пиперидин-2,6-диона и пирролидин-2,5-диона соответствующими галогенпроизводными в ДМФА с выделением целевых замещенных имидов методом препаративной хроматографии, что неприменимо для синтеза макроколичеств.

Таким образом, целью настоящего изобретения является применение нетоксичных производных глутаримидов, эффективных для лечения эозинофильных заболеваний, преимущественно аллергической природы, таких как бронхиальная астма, аллергический ринит, полипозные ринусиносопатии, эозинофильный колит, эозинофильный синдром, аллергический конъюнктивит, атопический дерматит, синдром Черджа-Стросса, анафилактический шок, отек Квинке, эозинофильный васкулит, эозинофильный эзофагит, эозинофильный гастроэнтерит и фиброзы.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к способу лечения эозинофильных заболеваний, включающему введение пациенту эффективного количества соединения



или его фармацевтически приемлемой соли или его применения по тому же назначению, раскрытого в заявке RU 2013116826 от 12.04.2013, где эозинофильное заболевание представляет собой бронхиальную астму, аллергический ринит, полипозные ринусиносопатии, эозинофильный колит, эозинофильный синдром, аллергический конъюнктивит, атопический дерматит, синдром Черджа-Стросса, анафилактический шок, отек Квинке, эозинофильный васкулит, эозинофильный эзофагит, эозинофильный гастроэнтерит или фиброзы.

Авторы обнаружили, что производные глутаримидов подавляют эозинофилию на различных моделях воспаления во всех оцениваемых биологических средах (кровь, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ)) и тканях. В частности, на модели сефадексиндуцированного воспаления легкого у крыс производные глутаримидов снижали содержание эозинофилов в БАЛ, на модели овальбумининдуцированной астмы у морских свинок производные глутаримидов снижали эозинофилию в БАЛ и крови.

Таким образом, настоящее изобретение относится к терапевтическому способу лечения эозинофильных заболеваний, преимущественно аллергической природы, предпочтительно бронхиальной астмы, аллергического ринита, полипозных ринусиносопатий, эозинофильного колита, эозинофильного синдрома, аллергического конъюнктивита, атопического дерматита, синдрома Черджа-Стросса, анафилактического шока, отека Квинке, эозинофильного васкулита, эозинофильного эзофагита, эозинофильного гастроэнтерита или фиброза, включающему введение пациенту эффективного количества указанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли.

Настоящее изобретение также относится к лекарственному средству для лечения эозинофильных заболеваний, преимущественно аллергической природы, предпочтительно бронхиальной астмы, аллергического ринита, полипозных ринусиносопатий, эозинофильного колита, эозинофильного синдрома, аллергического конъюнктивита, атопического дерматита, синдрома Черджа-Стросса, анафилактического шока, отека Квинке, эозинофильного васкулита, эозинофильного эзофагита, эозинофильного гастроэнтерита или фиброза, представляющему собой указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль.

Еще одним объектом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция для лечения эозинофильных заболеваний, преимущественно аллергической природы, предпочтительно бронхиальной астмы, аллергического ринита, полипозных ринусиносопатий, эозинофильного колита, эозинофильного синдрома, аллергического конъюнктивита, атопического дерматита, синдрома Черджа-Стросса, анафилактического шока, отека Квинке, эозинофильного васкулита, эозинофильного эзофагита, эозинофильного гастроэнтерита или фиброза, включающая эффективное количество указанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли и фармацевтически приемлемый носитель.

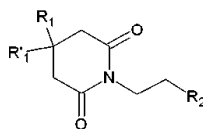
Синтез указанного соединения раскрыт в заявке RU 2013116826 от 12.04.2013.

Применяемое в настоящем изобретении соединение может быть получено способом, включающим нагревание исходных моноамидов дикарбоновых кислот с водоотнимающим агентом в среде органического растворителя или в среде самого водоотнимающего агента необязательно с добавлением ацетата натрия. В качестве водоотнимающих агентов в данном способе могут быть использованы ангидриды дикарбоновых кислот, хлорангидриды органических кислот и карбонилдимидазол.

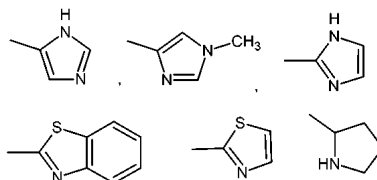
Исходные моноамиды дикарбоновых кислот, а также способы их получения раскрыты в публикации международной заявки WO 1999/001103.

Подробное описание изобретения

Предпочтительными используемыми в настоящем изобретении соединениями являются соединения общей формулы (I)



в которой R_1 и R'_1 независимо представляют собой водород или метил;
 R_2 представляет собой



Наиболее предпочтительными соединениями настоящего изобретения являются соединения, представленные в табл. 1.

Таблица 1

Номер соединения	Структура
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	

В качестве фармацевтически приемлемых солей соединений по настоящему изобретению могут быть использованы аддитивные соли органических кислот (например, формиат, ацетат, малеат, тартрат, метансульфонат, бензолсульфонат, толуолсульфонат и др.), аддитивные соли неорганических кислот (например, гидрохлорид, гидробромид, сульфат, фосфат и др.), соли с аминокислотами (например, соль аспарагиновой кислоты, соль глутаминовой кислоты и т.д.), предпочтительно хлоргидраты и ацетаты.

Производные глутаримидов общей формулы (I) обладают терапевтическим действием в отношении эозинофильных заболеваний.

В частности, соединения настоящего изобретения могут быть использованы для лечения бронхиальной астмы, аллергического ринита, полипозных риносинусопатий, эозинофильного колита, эозинофильного синдрома, аллергического конъюнктивита, атопического дерматита, синдрома Черджа-Стросса, анафилактического шока, отека Квинке, эозинофильного васкулита, эозинофильного эзофагита, эозинофильного гастроэнтерита и фиброзов.

Соединения настоящего изобретения вводят в эффективном количестве, которое обеспечивает желаемый терапевтический результат.

Соединения общей формулы (I) могут быть введены перорально, местно, парентерально, интраназально, ингаляционно и ректально в виде стандартных лекарственных форм, содержащих нетоксичные фармацевтически приемлемые носители.

Используемый в настоящем описании термин "парентеральное введение" означает подкожные, внутривенные, внутримышечные инъекции или вливания.

Соединения настоящего изобретения могут быть введены пациенту в дозах, составляющих от 0,1 до 30 мг/кг веса тела в день, предпочтительно в дозах от 0,25 до 10 мг/кг один или более раз в день.

При этом следует отметить, что конкретная доза для каждого конкретного пациента будет зависеть от многих факторов, включая активность данного используемого соединения, возраст, вес тела, пол, общее состояние здоровья и режим питания пациента, время и способ введения лекарственного средства, скорость его выведения из организма, конкретно используемую комбинацию лекарственных средств, а также тяжесть заболевания у данного индивида, подвергаемого лечению.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат соединение общей формулы (I) в количестве, эффективном для достижения желаемого результата, и могут быть введены в виде стандартных лекарственных форм (например, в твердой, полутвердой или жидкой формах), содержащих соединения настоящего изобретения в качестве активного ингредиента в смеси с носителем или наполнителем, пригодным для внутримышечного, внутривенного, перорального, сублингвального, ингаляционного, интраназального и интаректального введения. Активный ингредиент может быть включен в композицию вместе с обычно используемыми нетоксичными фармацевтически приемлемыми носителями, пригодными для изготовления растворов, таблеток, пилюль, капсул, драже, суппозитория, эмульсий, суспензий, мазей, гелей и любых других лекарственных форм.

В качестве наполнителей могут быть использованы различные вещества, такие как сахараиды, например глюкоза, лактоза или сахароза, манит или сорбит, производные целлюлозы и/или фосфаты кальция, например трикальций фосфат или кислый фосфат кальция. В качестве связующего компонента могут быть использованы такие вещества, как крахмальная паста, например кукурузный, пшеничный, рисовый, картофельный крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза и/или поливинилпирролидон. При необходимости могут быть использованы разрыхляющие агенты, такие как вышеупомянутые крахмалы и карбоксиметилкрахмал, поперечно сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или ее соль, такая как альгинат натрия.

Могут быть использованы необязательные добавки, такие как агенты, регулирующие текучесть, и смазывающие агенты, такие как диоксид кремния, тальк, стеариновая кислота и ее соли, такие как стеарат магния или стеарат кальция, и/или пропиленгликоль.

Ядро драже обычно покрывают слоем, который устойчив к действию желудочного сока. Для этой цели могут быть использованы концентрированные растворы сахаридов, которые могут необязательно содержать аравийскую камедь, тальк, поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль и/или диоксид титана, и подходящие органические растворители или их смеси.

В качестве добавок могут быть также использованы стабилизаторы, загустители, красители и отдушки.

В качестве мазевой основы могут быть использованы углеводородные мазевые основы, такие как вазелин белый и желтый (*Vaselinum album*, *Vaselinum flavum*), вазелиновое масло (*Oleum Vaselini*), мазь белая и жидкая (*Unguentum album*, *Unguentum flavum*), а в качестве добавок для придания более плотной консистенции, такие как твердый парафин и воск; абсорбтивные мазевые основы, такие как гидрофильный вазелин (*Vaselinum hydrophylicum*), ланолин (*Lanolinum*), кольдокрем (*Unguentum leniens*); мазевые основы, смываемые водой, такие как гидрофильная мазь (*Unguentum hydrophylum*); водорастворимые мазевые основы, такие как полиэтиленгликолевая мазь (*Unguentum Glycolis Polyethyleni*), бентонитовые основы и другие.

В качестве основы для гелей могут быть использованы метилцеллюлоза, натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, оксипропилцеллюлоза, полиэтиленгликоль, полиэтиленоксид или карбопол.

В качестве основы для суппозитория могут быть использованы основы, не растворимые в воде, такие как масло какао; основы, растворимые в воде или смешиваемые с водой, такие как желатино-глицериновые или полиэтиленоксидные; комбинированные основы мыльно-глицериновые.

При приготовлении стандартной лекарственной формы количество активного ингредиента, используемого в комбинации с носителем, может варьироваться в зависимости от реципиента, подвергающегося лечению, от конкретного способа введения лекарственного средства.

Так, например, при использовании соединений настоящего изобретения в виде растворов для инъекций содержание активного агента в них составляет до 5 мас.%. В качестве разбавителей могут быть использованы 0,9%-ный раствор хлорида натрия, дистиллированная вода, раствор новокаина для инъекций, раствор Рингера, раствор глюкозы, специфические добавки для растворения. При введении в организм соединений настоящего изобретения в виде таблеток и суппозитория их количество составляет до 200 мг на стандартную лекарственную форму.

Лекарственные формы настоящего изобретения получают по стандартным методикам, таким как, например, процессы смешивания, гранулирования, формирование драже, растворение и лиофилизация.

Следует отметить, что для соединений настоящего изобретения не выявлено отрицательных побочных действий и не обнаружено противопоказаний к применению. При этом при исследовании токсичности соединений настоящего изобретения в дозе 1500 мг/кг, перорально, не зарегистрировали гибели экспериментальных животных.

Детальное описание соединений настоящего изобретения, исследования фармакологической активности представлены в нижеследующих примерах, предназначенных для иллюстрации предпочтительных вариантов осуществления изобретения и не ограничивающих его объем.

Экспериментальная часть.

Синтез указанных выше производных глутаримидов общей формулы (I) раскрыт в заявке RU 2013116826 от 12.04.2013.

Примеры синтеза производных глутаримидов общей формулы (I).

Средства и методы.

Индивидуальность полученных соединений проверяют методом ТСХ на пластинках "Kieselgel 60 F254" (фирмы "Merck", Германия) в системе растворителей: хлороформ-метанол (9:1) (1), хлороформ-метанол (1:1) (2).

Хроматограммы и электрофореграммы проявляют хлортетраметилбензидиновым реактивом и реактивом Паули.

ЖХ МС-система анализа многокомпонентных смесей Shimadzu Analytical HPLC SCL10Avp, масс-спектрометр PE SCIEX API 165 (150) (Канада). Условия: колонка Waters ACQUITY UPLC BEH C18 1.7um 2.1x50 mm, градиент элюирования в системе вода с 0,1% HCOOH - ацетонитрил с 0,1% HCOOH.

Аналитическую обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили на приборе: хроматограф HPLC Shimadzu в условиях: колонка Luna C18 (2) 100A 250x4,6 мм (сер. 599779-23), градиент элюирования в системе фосфатный буферный раствор pH 3,0:метанол (условия А); колонка Merk.LiChroCART 250x4 мм 5 мкм. Li-Chrospher 100RP-8E 5 мкм.C8. Serial number 1.50837.0001, градиент элюирования в системе ацетатно-аммиачный буферный раствор pH 7,5:ацетонитрил (условия Б); градиент элюирования в системе буфер с 1-гексилсульфонатом натрия 0,0025M pH 3:ацетонитрил (условия В); колонка Symmetry C18 150x4,6 мм, градиент элюирования в системе буферный раствор с 1-гексилсульфонатом натрия 0,0025M pH 3:ацетонитрил (условия С).

¹H-ЯМР-спектры регистрируют на приборе Bruker DPX-400 (Германия).

Масс-спектры высокого разрешения получают на времяпролетном масс-спектрометре методом матричной лазерно-десорбционной ионизации с использованием в качестве матрицы 2,5-дигидроксibenзойной кислоты на приборе Ultraflex ("Bruker", Германия).

Пример 1. 1-(2-(1H-имидазол-4-ил)этил)пиперидин-2,6-дион (соединение 1).

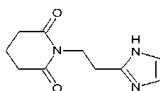
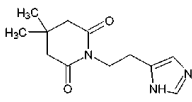
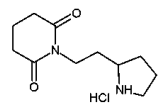
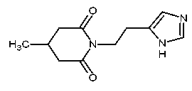
В плоскодонную колбу (250 мл) загружают 60 мл N,N'-диметилформамида и 20 г 2-(имидазол-4-ил)этанамид пентандиовой-1,5 кислоты. При интенсивном перемешивании прибавляют 17,3 г (1,2 экв.) карбонилдиимидазола. Реакционную массу нагревают при перемешивании до 90°C в течение 2 ч, контроль реакции методом ¹H NMR (пробу, 0,5 мл, разбавляют серным эфиром, выпавший осадок растворяют в DMSO d₆). При отсутствии исходной 2-(имидазол-4-ил)этанамид пентандиовой-1,5 кислоты в реакционной массе ее охлаждают и выливают в трехкратный объем метил-трет-бутилового эфира (180 мл). Оставляют при перемешивании на 1 ч, выпавший осадок отфильтровывают, промывают 60 мл метил-трет-бутилового эфира, сушат. Выход технического 1-(2-(1H-имидазол-4-ил)этил)пиперидин-2,6-диона составляет 12,4 г (67%).

В плоскодонную колбу на 100 мл загружают 12 г технического 1-(2-(1H-имидазол-4-ил)этил)пиперидин-2,6-диона и 36 мл изопропанола. Смесь нагревают до полного растворения осадка, затем прибавляют 1,2 г активированного угля и выдерживают при кипячении в течение часа. Раствор еще горячим быстро отфильтровывают через предварительно нагретый керамический фильтр. Осадок на фильтре промывают 6 мл горячего изопропанола. Горячий маточный раствор охлаждают до комнатной температуры и оставляют на ночь при перемешивании для кристаллизации. Выпавшие кристаллы отфильтровывают, промывают 6 мл холодного изопропанола, сушат. Выход 1-(2-(1H-имидазол-4-ил)этил)пиперидин-2,6-диона после перекристаллизации составляет 10,1 г (84%). R_f 0,43 (1). Продукт анализировали методом ЖХ МС, индивидуальный пик, время удерживания 1,57 мин, [M+H]⁺=208. ВЭЖХ в условиях А: индивидуальный пик, время удерживания 15,5 мин. Спектр ЯМР ¹H (400,13 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 1,81 (пент. 2H, CH₂CH₂CH₂, J=6,5 Гц); 2,58 (м, 6H, CH₂C, CH₂CH₂CH₂); 3,82 (т, 2H, CH₂N, J=7,8 Гц); 6,77 (уш. с, 1H, CSH); 7,49 (с, 1H, NCHN); 11,81 (уш.с, 1H, NH).

При необходимости для синтеза соединений по настоящему изобретению применяют защиту атома азота в гетероциклах, например защитную группу карбаматного типа, такую как трет-бутоксикарбонильная (Boc).

По аналогичным вышеуказанной методикам получены следующие соединения, представленные в табл. 2.

Таблица 2

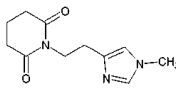
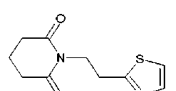
Номер соединения	Структурная формула	Физико-химические данные
2		ЖХ МС, индивидуальный пик, время удерживания 0,41 мин, $[M+H]^+=208$. ВЭЖХ в условиях В, индивидуальный пик, время удерживания 16,72 мин. Спектр ЯМР 1H (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 1,82 (пент. 2H, $CH_2CH_2CH_2$, J=6,5 Гц); 2,57 (т, 4H, $CH_2CH_2CH_2$, J=6,5 Гц); 2,72 (т, 2H, CH_2C , J=7,5 Гц); 3,90 (т, 2H, CH_2N , J=7,5 Гц); 6,86 (с, 2H, CHN); 11,72 (уш.с, 1H, NH)
3		ЖХ МС, индивидуальный пик, время удерживания 0,41 мин, $[M+H]^+=236$. ВЭЖХ в условиях А, индивидуальный пик, время удерживания 22,16 мин. Спектр ЯМР 1H (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 0,91 (с, 6H, CH_3); 2,58 (м, 6H, CH_2C , CH_2CCCH_2); 3,86 (т, 2H, CH_2N , J=7,3 Гц); 6,60, 6,85 (уш.с, 1H, CCN); 7,50 (уш.с, 1H, $NCHN$); 11,8 (уш.с, 1H, NH)
7		ЖХ/МС, индивидуальный пик, время удерживания 0,74 мин, $[M+H]^+=211$. ВЭЖХ в условиях С, индивидуальный пик, время удерживания 10,8 мин. Спектр ЯМР 1H (400.13МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц) 1.52 (м, 1H, пирролидин), 1.72 (м, 1H, пирролидин), 1.86 (м, 5H, пирролидин+ $CH_2CH_2COCH_2CH_2CO$), 2.10 (м, 1H, пирролидин), 2.61 (т,
		4H, $COCH_2CH_2CH_2CO$, J=6.4 Hz), 3.10 (м, 2H, пирролидин), 3.30 (м, 1H, пирролидин), 3.68 (м, 2H, CH_2N), 8.93 (с, 1H, NH)
8		ЖХ/МС, индивидуальный пик, время удерживания 1,9 мин, $[M+H]^+=222$. ВЭЖХ в условиях С, индивидуальный пик, время удерживания 13,8 мин. Спектр ЯМР 1H (400.13МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 0.95 (д, 3H, CH_3 , J=6.5 Hz), 2.15 (м, 1H, $COCH_2CH_2CH_2CO$); 2.35 (м, 2H, CH_2C); 2.62 (м, 4H, $COCH_2CH_2CH_2CO$), 3.82 (т, 2H, CH_2N , J=7.8 Hz), 6.80 (с, 1H, CCN), 7.56 (с, 1H, $NCHN$)

Пример 2. 1-(2-(1,3-бензотиазол-2-ил)этил)пиперидин-2,6-дион (соединение 4).

Смесь 22 г (0,075моль) 2-(1,3-бензотиазол-2-ил)этанамид пентандиовой-1,5 кислоты и 23 г (0,225 моль) уксусного ангидрида кипятят в 150 мл диоксана 3 ч. Диоксан удаляют в вакууме, добавляют 200 мл воды, нейтрализуют 30%-ным гидроксидом натрия до нейтральной среды. Выпавшее масло затирают в кристаллы. Осадок очищают колоночной хроматографией (SiO_2 60-100мкм, элюент: этилацетат-гексан(1:1)). Получают 16.5 г (79.9%). ЖХ/МС, индивидуальный пик, время удерживания 2,26 мин, $[M+H]^+=275$. ВЭЖХ в условиях А, индивидуальный пик, время удерживания 9,3 мин. Спектр ЯМР 1H (400.13 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 1.85 (pent. 2H, $CH_2CH_2CH_2$, J=6.8 Hz); 2.59 (т, 4H, $CH_2CH_2CH_2$, J=6.8 Hz); 3.24 (т, 2H, CH_2C , J=7.3 Hz); 4.08 (т, 2H, CH_2N , J=7.3 Hz); 7.43, 7.49 (т, 1H, Ar, J=7,6 Hz); 7.96, 8.04 (д, 1H, Ar, J=7,6 Hz).

В соответствии с вышеуказанной методикой получены следующие соединения, представленные в табл. 3.

Таблица 3

Номер соединения	Структурная формула	Физико-химические данные
5		ЖХ/МС, индивидуальный пик, время удерживания 0,21 мин, $[M+H]^+=222$. ВЭЖ в условиях Б, индивидуальный пик, время удерживания 20,7 мин. Спектр 1H -ЯМР (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J /Гц): 1,82 (пент. 2Н, $CH_2CH_2CH_2$, $J=6,4$ Гц), 2,53 (м, 2Н, CH_2C), 2,58 (т, 4Н, $CH_2CH_2CH_2$, $J=6,4$ Гц), 3,57 (с, 3Н, NMe), 3,80 (т, 2Н, CH_2N , $J=7,8$ Гц), 6,85 (с, 1Н, SCH), 7,42 (с, 1Н, NCHN)
6		ЖХ/МС, индивидуальный пик, время удерживания 1,43 мин, $[M+H]^+=225$. ВЭЖ в условиях А, индивидуальный пик, время удерживания 31,28 мин. Спектр 1H -ЯМР (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J /Гц): 1,82 (пент. 2Н, $CH_2CH_2CH_2$, $J=6,5$ Гц), 2,58 (т, 4Н, $CH_2CH_2CH_2$, $J=6,5$ Гц), 3,12 (т, 2Н, CH_2C , $J=7,4$ Гц), 3,97 (т, 2Н, CH_2N , $J=7,4$ Гц), 7,58 (д, 1Н, SCH, $J=3,2$ Гц), 7,70 (д, 1Н, NCH, $J=3,2$ Гц)

Пример 3. Таблетки, покрытые оболочкой, 2, 10 и 100 мг.

Состав на одну таблетку, покрытую оболочкой

Дозировка	2 мг	10 мг	100 мг
Активное вещество:			
соединение общей формулы I	2,00 мг	10 мг	100 мг
Вспомогательные вещества:			
микрористаллическая целлюлоза	47,70 мг	70,55 мг	95,90 мг
лактоза моногидрат	49,00 мг	67,50 мг	99,00 мг
натрия гликолят крахмал	0,50 мг	0,75 мг	1,50 мг
тальк	0,40 мг	0,60 мг	1,20 мг
магния стеарат	0,40 мг	0,60 мг	2,40 мг
Масса ядра таблетки	100,00 мг	150,00 мг	300,00 мг
Пленочное покрытие	3,00 мг	4,50 мг	9,00 мг
Масса таблетки	103,00 мг	154,50 мг	309,00 мг

Тесты на биологическую активность.

Средства и методы.

Морфологическое исследование гистологических препаратов проводили при помощи светооптического микроскопа Leica DM LS (Leica Microsystemс, Германия). Микроморфометрическое исследование выполняли с помощью окуляр-микрометра микроскопа Leica DM LS. Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры Leica DC320 (Leica Microsystemс, Германия).

Математическую обработку полученных результатов проводили методами вариационной статистики при помощи программы Statistica 6.0. Для анализа данных применяли описательную статистику: данные проверяли на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. Поскольку данные принадлежали к нормальному распределению, межгрупповые различия анализировали параметрическими методами с помощью критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Далее приведен неограничивающий перечень примеров, иллюстрирующих биологическую активность заявленных соединений общей формулы (I).

Пример 4. Оценка эффективности соединений общей формулы (I) на модели астмы у морских свинок.

Индукцию бронхиальной астмы у морских свинок осуществляли по стандартной методике [Ricciardolo F.L., Nijkamp F., De Rose V., Folkerts G. The guinea pig as an animal model for asthma//Current Drug

Targets. 2008 Jun; 9(6):452-65]. Животных иммунизировали однократным внутрибрюшинным введением 0,5 мл раствора, содержащего 100 мкг/мл овальбумина (Sigma) и 100 мг/мл гидроокиси алюминия. Интактным животным внутрибрюшинно вводили физ. раствор в объеме 0,5 мл.

На 29, 30 и 31 день эксперимента проводили провокацию гиперреактивности дыхательных путей путем ингаляционного введения овальбумина в возрастающих концентрациях - 0,1, 0,3 и 0,5 мг/мл в 1, 2 и 3 день провокации соответственно. Ингаляцию осуществляли в течение 5 мин или до появления выраженных признаков асфиксии (падение на бок). На 32-й день животным вводили разрешающую дозу овальбумина - 1 мг/мл в течение 5 мин с оценкой бронхоспастической реакции.

Исследуемые соединения вводили животным внутривенно ежедневно один раз в день в течение 6 или 10 суток, заканчивая за 2 суток до введения разрешающей дозы антигена.

Оценку бронхоспастической реакции проводили по изменению частоты и глубины дыхательных движений, а также по такому признаку асфиксии, как падение животного на бок. Спирограмму регистрировали с помощью оборудования для лабораторных исследований ADInstruments (Австралия) с использованием базовой регистрирующей станции PowerLab 8sp. и программы LabCart. Для регистрации использовали датчик воздушного потока для лабораторных животных и спирограф со встроенным усилителем (ADInstruments).

Через 24 ч после введения разрешающей дозы овальбумина у животных отбирали бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) и кровь из полостей сердца. Взятие БАЛ проводили под наркозом путем промывания легких 5-ю мл подогретого до 37°C физиологического раствора через трахею при помощи шприцевого дозатора.

В жидкости бронхоальвеолярного смыва с помощью камеры Горяева подсчитывали абсолютное количество клеточных элементов в 1 мкл смыва (цитоз). Затем БАЛ центрифугировали при 200 g в течение 10 мин. Из осадка клеток готовили мазки, которые в дальнейшем фиксировали в метаноле и окрашивали по Романовскому-Гимзе для подсчета эндопульмональной цитогаммы.

Кровь анализировали на гемоцитометре с целью определения лейкоформулы.

Исследование включало 3 эксперимента, в первом производилась оценка влияния исследуемых соединений № 1-6 на клеточный состав БАЛ, во втором и третьем - оценка влияния соединений № 1 и № 2 на клеточный состав БАЛ, клеточный состав крови и на выраженность бронхоспазма.

10-кратное введение соединений № 1-6 морским свинкам в дозе 14 мг/кг снизило увеличенное на фоне развития патологии количество клеточных элементов в БАЛ с $17,3 \times 10^9$ до $2,5-6,3 \times 10^9$ кл/л (табл. 4). Преимущественно исследуемые соединения снизили количество эозинофилов: в контрольной группе количество эозинофилов в БАЛ составило $7,05 \times 10^9$ кл/л, в группах, получавших лечение, - $0,60-1,61 \times 10^9$ кл/л, т.е. на 91-77% меньше.

Таблица 4

Количество клеточных элементов в БАЛ на модели
бронхиальной астмы у морских свинок ($M \pm m$, $n=9$)

Группа	Доза соединения, мг/кг	Количество о введений	Цитоз, $10^9/л$	Эозинофилы, $10^9/л$	Нейтрофилы, $10^9/л$	Моноциты, $10^9/л$	Лимфоциты, $10^9/л$
Интактные	-		$1,0 \pm 0,1$	$0,07 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,05$	$0,38 \pm 0,04$
Контроль	-		$17,3 \pm 1,9^*$	$7,05 \pm 0,68^*$	$1,78 \pm 0,46$	$2,70 \pm 0,59^*$	$4,92 \pm 1,02^*$
Соединение 1	14	10	$2,5 \pm 0,5^*$	$0,89 \pm 0,23^*$	$0,36 \pm 0,09$	$0,35 \pm 0,09^*$	$0,70 \pm 0,13^*$
Соединение 2			$6,3 \pm 1,1^*$	$1,30 \pm 0,29^*$	$1,05 \pm 0,16^*$	$0,60 \pm 0,14^*$	$1,53 \pm 0,50^*$
Соединение 3			$2,9 \pm 0,4^*$	$0,93 \pm 0,31^*$	$0,36 \pm 0,08$	$0,71 \pm 0,18^*$	$0,72 \pm 0,08^*$
Соединение 4			$3,5 \pm 1,1^*$	$1,25 \pm 0,34^*$	$0,43 \pm 0,12$	$0,85 \pm 0,19^*$	$0,81 \pm 0,11^*$
Соединение 5			$5,9 \pm 1,5^*$	$1,61 \pm 0,86^*$	$1,05 \pm 0,33$	$0,84 \pm 0,23^*$	$1,35 \pm 0,34^*$
Соединение 6			$4,9 \pm 1,2^*$	$0,60 \pm 0,21^*$	$0,97 \pm 0,28^*$	$0,83 \pm 0,18^*$	$1,03 \pm 0,24^*$

Примечание.

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$;

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Введение исследуемых соединений в более низких дозах (0,045, 0,14 и 1,4 мг/кг) и в двух режимах (10- и 6-кратно) показало, что соединения снижают эозинофилию в БАЛ в широком диапазоне доз (0,045-14 мг/кг) и при разных схемах лечения (табл. 5). Помимо этого во всех тестируемых дозах исследуемые соединения снизили количество лимфоцитов и в некоторых дозах количество моноцитов в БАЛ, что свидетельствует о подавлении местной воспалительной реакции в легком.

Таблица 5

**Количество клеточных элементов в БАЛ на модели
бронхиальной астмы у морских свинок ($M \pm m$, $n=8$)**

Группа	Доза соединени я, мг/кг	Количество введений	Цитоз, 10 ⁹ /л	Эозинофилы, 10 ⁹ /л	Нейтрофилы, 10 ⁹ /л	Моноциты, 10 ⁹ /л	Лимфоциты , 10 ⁹ /л
Эксперимент №1							
Интактные	-		0,22±0,01	0,02±0,002	0,06±0,003	0,06±0,006	0,075±0,008
Контроль	-		19,3±0,2*	0,96±0,17*	0,18±0,047*	0,54±0,06*	0,24±0,03*
Соединение 1	0,045	10	12,8±0,2*	0,45±0,07* &	0,19±0,08	0,52±0,092*	0,10±0,04 &
	0,14		10,5±0,2* &	0,41±0,10* &	0,07±0,01	0,43±0,076*	0,13±0,04 &
	14		14,6±0,3*	0,45±0,12* &	0,15±0,03*	0,7±0,16*	0,15±0,026* &
Эксперимент №2							
Интактные	-		0,02±0,003	0,02±0,003	0,05±0,007	0,05±0,001	0,07±0,01
Контроль	-		0,14±0,02*	0,67±0,07*	0,11±0,003	0,49±0,09*	0,16±0,02*
Соединение 2	0,14	6	0,55±0,09* &	0,20±0,03* &	0,03±0,008* &	0,24±0,06* &	0,07±0,02 &
	1,4		0,63±0,09* &	0,18±0,02* &	0,09±0,002	0,29±0,07*	0,06±0,01 &
	14		0,56±0,008* &	0,21±0,06* &	0,07±0,002	0,22±0,05* &	0,07±0,009 &

Примечание.

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$;

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Исследуемые соединения снизили эозинофилию крови. В группе контроля количество эозинофилов в крови в 6-8 раз превышало данный показатель интактных животных. Введение исследуемых соединений позволило сохранить его на уровне интактных животных (табл. 6).

Таблица 6

**Количество клеточных элементов в крови на модели
бронхиальной астмы у морских свинок ($M \pm m$, $n=8$)**

Группа	Доза соеди- нения , мг/кг	Коли- чество введений	Цитоз, 10 ⁹ /л	Палочко- ядерные нейтрофил ы 10 ⁹ /л	Сегменто- ядерные нейтрофилы , 10 ⁹ /л	Эозинофил ы 10 ⁹ /л	Базофилы , 10 ⁹ /л	Моноциты 10 ⁹ /л	Лимфоциты , 10 ⁹ /л
Эксперимент №1									
Интактные	-		6,09±0,68	0,08±0,02	2,29±0,35	0,08±0,04	0±0	0,10± 0,04	2,66±0,49
Контроль	-		12,51±0,68 *	0,37±0,11	3,92±0,43	0,46±0,06 *	0±0	0,58±0,1 6*	7,45±0,62 *
Соединени е 1	0,045	10	9,03±1,40&	0,31±0,10	2,92±0,65	0,19±0,04 &	0±0	0,29±0,0 8	4,80±0,84 *
	0,14		9,11±1,07* &	0,19±0,05 &	2,23±0,58&	0,09±0,03 &	0±0	0,33±0,0 6*	5,25±0,89 *
	14		8,90±0,25* &	0,27±0,06 *	3,66±0,22*	0,13±0,04 &	0±0	0,33±0,0 6*	4,45±0,25 *
Эксперимент №2									
Интактные			5,89±0,31	0,14±0,04	2,15±0,26	0,05±0,03	0±0	0,15±0,0 5	3,41±0,32
Контроль			13,26±0,55 *	0,33±0,11	5,34±0,71*	0,39±0,07 *	0±0	0,38±0,0 9*	6,81±0,49 *
Соединени е 2	0,14	6	7,80±0,77* &	0,18±0,04	3,41±0,41* &	0,09±0,03 &	0±0	0,18±0,0 6	3,95±0,54 &
	1,4		7,70±0,40* &	0,21±0,03	3,53±0,37* &	0,1±0,03 &	0±0	0,18±0,0 6	3,68±0,25 &
	14		6,93±0,77 &	0,17±0,04	2,9±0,38&	0,1±0,04 &	0±0	0,24±0,0 8	3,51±0,41 &

Примечание.

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$;

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Определение выраженности бронхоспазма у морских свинок в ответ на ингалирование им провокационной дозы овальбумина позволило установить, что на модели бронхиальной астмы исследуемые соединения снижают не только эозинофилию, но и клинические проявления заболевания. В частности, если в группе контроля, получавшей плацебо, из 8-ми животных 5 имели выраженный бронхоспазм с острой и подострой фазами, то в группах животных, получавших исследуемые соединения, такие животные либо отсутствовали, либо их количество не превышало 2 шт. В свою очередь количество животных с нормальной глубиной и частотой дыхания (без бронхоспазма) возрастало с 0-1 шт. в группе контроля до 4-7 шт. в группах, получавших лечение (табл. 7).

Таблица 7

**Выраженность бронхоспазма у морских свинок
на модели бронхиальной астмы**

Группа	Доза соединения , мг/кг	Количество о введений	Количество животных (n=8)			
			Без бронхоспазма	с умеренно выраженным бронхоспазмом (без острой, с подострой фазой, с восстановлением дыхания)	с умеренно выраженным бронхоспазмом (без острой, с подострой фазой, без восстановления дыхания)	с выраженным бронхоспазмом (с острой и подострой фазой)
Эксперимент №1						
Интактные	-		8	0	0	0
Контроль	-		0	0	3	5
Соединение 1	0,045	10	5	1	2	0
	0,14		7	1	0	0
	14		5	0	2	1
Эксперимент №2						
Интактные	-		8	0	0	0
Контроль	-		1	1	1	5
Соединение 2	0,14	6	4	1	1	2
	1,4		4	0	3	1
	14		5	1	0	2

Полученные результаты дают убедительные доказательства того, что на экспериментальных моделях эозинофилии, в частности бронхиальной астмы и др., исследуемые соединения подавляют эозинофилию и снижают клинические проявления заболевания.

Пример 5. Оценка эффективности соединений общей формулы (I) на модели сефадексиндуцированного эозинофильного воспаления легких у крыс.

Модель сефадексиндуцированного эозинофильного воспаления легких у крыс реализовали по стандартной методике [Evaldsson C., Ryden I., Uppugunduri S. Isomaltitol exacerbates neutrophilia but reduces eosinophilia: new insights into the sephadex model of lung inflammation//Int Arch Allergy Immunol. 2011; 154(4):286-94]. Крысам-самцам линии Вистар однократно ингаляционно вводили Сефадекс G-200 (Pharmacia, Sweden) в дозе 5 мг/кг. Исследуемые соединения вводили животным внутрижелудочно четырехкратно: за 24 и 1 ч до, а также 24 и 45 ч после введения сефадекса. Препарат сравнения будесонид вводили по той же схеме ингаляционно в дозе 0,5 мг/кг. Через 48 ч после ингаляции сефадекса производили забор бронхоальвеолярного лаважа. В лаваже оценивали суммарное количество лейкоцитов и определяли лейкоцитарную формулу. Количество крыс в группе - 7-10 шт.

Анализ БАЛ показал, что однократное ингаляционное введение сефадекса G-200 крысам вызывает выраженный приток лейкоцитов в легкое. Количество всех клеточных типов было увеличено в группе контроля по сравнению с интактными, однако максимальное увеличение было отмечено в отношении эозинофилов (табл. 8, 9).

Внутрижелудочное введение соединений общей формулы (I) крысам снизило содержание эозинофилов в БАЛ в несколько раз. Заявляемые соединения проявляют активность в широком диапазоне тестируемых доз.

Таблица 8

Количество клеточных элементов в БАЛ на модели
сефадексиндуцированного эозинофильного воспаления легких у крыс ($M \pm m$, $n=10$)

Группа	Количество клеточных элементов в 1 мкл БАЛ				
	Лейкоциты	Нейтрофилы	Эозинофилы	Макрофаги	Лимфоциты
Интактные	865±78	35±9	13±4	770±66	46±12
Контроль	2785±152*	711±158*	444±45*	1469±197*	161±44*
Соединение 1 (0,06 мг/кг)	2500±307*	837±231*	118±27*&	1417±131*	128±48
Соединение 1 (0,18 мг/кг)	2665±455*	597±168*	174±64*&	1661±260*	143±54
Соединение 1 (0,54 мг/кг)	2120±218*&	352±135*	126±43*&	1446±113*	196±63*
Соединение 1 (1,8 мг/кг)	1915±250*&	451±149*	129±44*&	1214±130*	122±49
Соединение 1 (5,4 мг/кг)	2340±322*	492±129*	152±56*&	1525±199*	170±45*
Соединение 1 (18 мг/кг)	2135±205*&	297±89*&	69±22*&	1601±134*	168±44*
Будесонид (0,5 мг/кг)	1805±318*&	334±119*	204±84*&	1230±205	37±10&

Примечание.

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$;

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Таблица 9

Количество клеточных элементов в БАЛ на модели
сефадексиндуцированного эозинофильного воспаления легких у крыс ($M \pm m$, $n=7$)

Группа	Количество клеточных элементов в 1 мкл БАЛ				
	Лейкоциты	Нейтрофилы	Эозинофилы	Макрофаги	Лимфоциты
Интактные	2471±611	150±63	39±31	1532±225	31±26
Контроль	5207±814*	785±163*	630±104*	3471±412*	275±103
Соединение 5 (1,8 мг/кг)	2064±257&	385±57*	147±44&	1576±93&	66±26
Соединение 5 (18 мг/кг)	2189±222&	605±124	34±15&	1331±66 &	121±48
Соединение 7 (1,8 мг/кг)	2242±289&	389±188	28±16&	913±235&	16±10
Соединение 7 (18 мг/кг)	1725±345&	136±50&	164±62 &	909±299&	29±17
Соединение 8 (1,8 мг/кг)	2796±333 &	303±104&	202±53*&	1860±204&	82±44
Соединение 8 (18 мг/кг)	4250±576	583±180	318±65*&	2050±462&	64±45

Примечание.

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$;

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Пример 6. Оценка эффективности соединений общей формулы (I) на модели лейкотриениндуцированного эозинофильного воспаления легких у морских свинок.

Модель лейкотриениндуцированного эозинофильного воспаления легких у морских свинок реализовали по стандартной методике [Underwood D.C., Osborn R.R., Newsholme S.J., Torphy T.J., Hay D.W. Persistent airway eosinophilia after leukotriene (LT) D4 administration in the guinea pig: modulation by the LTD4 receptor antagonist, pranlukast, or an interleukin-5 monoclonal antibody//Am J Respir Crit Care Med. 1996 Oct;154(4 Pt 1):850-7]. Самцам морских свинок (250-300 г) в условиях двухкамерного плетизмографа (Emka Technologies, France) в течение 1 мин ингалировали раствор лейкотриена D4 (LTD4, Cayman Chemical, USA) концентрацией 10 мкг/мл (скорость потока - 250 мл/мин). Исследуемое соединение вводили животным внутрижелудочно четырехкратно: за 24 и 1 ч до, а также 24 и 45 ч после ингаляции LTD4. Препарат сравнения монтелукаст (0.8 мг/кг) вводили внутрижелудочно однократно за 1 ч до ингаляции LTD4. Через 48 ч после ингаляции LTD4 производили забор бронхоальвеолярного лаважа. В лаваже оценивали суммарное количество лейкоцитов и определяли лейкоцитарную формулу. Количество морских свинок в группе - 8 шт.

Анализ БАЛ показал, что однократное ингаляционное введение лейкотриена D4 морским свинкам вызывает выраженный приток нейтрофилов, эозинофилов и моноцитов/макрофагов в легкое. Наиболее выраженное увеличение количества клеток (в 25 раз) наблюдалось в отношении эозинофилов (табл. 10).

Внутрижелудочное введение исследуемого соединения морским свинкам снизило содержание эозинофилов в БАЛ в 2.1-3.4 раза. Соединение оказало эффект в широком диапазоне доз (0.14-14 мг/кг). Сравнительный анализ эффективности исследуемого соединения и монтелукаста показал, что по выраженности действия исследуемое соединение не уступает антагонисту лейкотриеновых рецепторов.

Таблица 10

Количество клеточных элементов в БАЛ на модели лейкотриениндуцированного эозинофильного воспаления легких у крыс ($M \pm m$, $n=8$)

Группа	Количество клеточных элементов в 1 мкл БАЛ				
	Лейкоциты	Нейтрофилы	Эозинофилы	Макрофаги	Лимфоциты
Интakтные	556±83	21±4	79±26	357±55	100±32
Контроль	5788±1269*	303±66*	1966±391*	3392±895*	126±35
Соединение 1 (0,14 мг/кг)	2638±463*&	249±50	916±144*&	1360±323*	112±27
Соединение 1 (1,4 мг/кг)	3413±1022*	279±97*	856±288*&	2134±705*	144±89
Соединение 1 (14 мг/кг)	2250±373*&	155±36*	580±124*&	1444±258*	71±28
Монтелукаст (0,8 мг/кг)	24065±415*&	173±41*	618±116*&	1519±263*	96±39

Примечание.

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$;

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Пример 7. Оценка эффективности соединений общей формулы (I) на модели аллергического ринита у морских свинок.

Модель аллергического ринита реализовали по стандартной методике [Vishnu N. Thakare, M.M. Osama, Suresh R. Naik. Therapeutic potential of curcumin in experimentally induced allergic rhinitis in guinea pigs//Int Immunopharmacol. 2013 Sep;17(1):18-25].

Морских свинок (250-300 г) иммунизировали 4-кратным (на 0, 7, 14 и 21 сутки) внутрибрюшинным введением смеси овальбумина (100 мкг/свинка) и гидроксида алюминия (5 мг/свинка), разведенных и суспендированных в физиологическом растворе. На 28-е сутки исследования раствор овальбумина (60 мг/мл) животным вводили интраназально по 20 мкл в каждую ноздрю. На 35-е сутки животным вводили раствор ОВА (200 мкг/мл, 25 мкл) внутрикожно, предварительно выбрив участок кожи на спине. Подтверждением наличия сенсибилизации было формирование отека и покраснения в месте инъекции. На 42-е сутки исследования проводили интраназальное введение раствора ОВА (60 мг/мл, 20 мкл/ноздю). С целью контроля формирования именно аллергического воспаления была сформирована группа ложно-иммунизированных животных: на 0, 7, 14 и 21 сутки свинки получали раствор гидроксида алюминия (5 мг/свинка), на 28-е и 35-е сутки - физ. раствор, на 42-е - ОВА (60 мг/мл, 20 мкл/ноздю).

Исследуемые соединения (14 мг/кг) вводили животным внутрижелудочно 3-кратно: за 48, 24 и 1 ч до последнего интраназального введения ОВА. Препарат сравнения дексаметазон вводили внутрижелудочно однократно - за 3 ч до последнего интраназального введения ОВА.

В течение 2 ч после последнего введения ОВА проводили оценку клинических проявлений ринита: подсчитывали количество чихов, почесываний носа. Через 24 ч после последнего введения овальбумина производили забор назального смыва. В назальном смыве оценивали суммарное количество лейкоцитов и определяли лейкоцитарную формулу. Количество морских свинок в группе - 8 шт.

Анализ назального смыва показал, что аллергический ринит сопровождается выраженным притоком лейкоцитов в полость носа. Максимальное увеличение было отмечено в отношении количества эозинофилов (табл. 11).

Трехкратное внутрижелудочное введение соединений общей формулы (I) морским свинкам снизило содержание эозинофилов в назальном смыве до уровня ложноиммунизированных животных. По выраженности действия исследуемые соединения не уступали дексаметазону.

Таблица 11

Количество клеточных элементов в назальном смыве морских свинок на модели аллергического ринита ($M \pm m$, $n=8$)

Группа	Количество клеточных элементов в 1 мкл назального смыва				
	Лейкоциты	Нейтрофилы	Эозинофилы	Макрофаги	Лимфоциты
Ложная иммунизация	1371 $\pm$ 181	424 $\pm$ 30	267 $\pm$ 38	712 $\pm$ 125	8 $\pm$ 6
Контроль	3029 $\pm$ 286*	753 $\pm$ 121*	1265 $\pm$ 226*	439 $\pm$ 132	8 $\pm$ 8
Соединение 1 (14 мг/кг)	1300 $\pm$ 254&	243 $\pm$ 58*&	521 $\pm$ 129&	405 $\pm$ 130	6 $\pm$ 6
Соединение 5 (14 мг/кг)	1071 $\pm$ 233&	344 $\pm$ 50&	575 $\pm$ 143&	198 $\pm$ 54*	9 $\pm$ 7
Дексаметазон (5 мг/кг)	1186 $\pm$ 142&	328 $\pm$ 47&	365 $\pm$ 90&	296 $\pm$ 71*	5 $\pm$ 3

Примечание.

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$;

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Учет клинических проявлений аллергического ринита в течение 2 ч после последнего интраназального введения ОВА животным показал выраженное увеличение у экспериментальных животных количества чихов и почесываний носа, что свидетельствует о корректности реализованной модели аллергического ринита. Терапия соединениями общей формулы (I) снизила клинические проявления ринита до уровня ложноиммунизированных животных. Препарат сравнения дексаметазон оказал сходное действие (табл. 12).

Таблица 12

Клинические проявления аллергического ринита у морских свинок на экспериментальной модели ($M \pm m$, $n=8$)

Группа	Количество чихов/2 часа	Количество почесываний носа/2 часа
Ложная иммунизация	5, 3 $\pm$ 1, 2	9, 7 $\pm$ 1, 3
Контроль	16, 3 $\pm$ 2, 6*	45, 3 $\pm$ 5, 2*
Соединение 1 (14 мг/кг)	5, 9 $\pm$ 1, 1 &	13, 9 $\pm$ 2, 6 &
Соединение 5 (14 мг/кг)	7, 1 $\pm$ 1, 3 &	19, 1 $\pm$ 4, 9 &
Дексаметазон (5 мг/кг)	7, 9 $\pm$ 0, 8 &	16, 7 $\pm$ 1, 8*&

Примечание.

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$;

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Пример 8. Оценка эффективности соединений общей формулы (I) на модели атопического дерматита у мышей.

Модель атопического дерматита реализовали по стандартной методике [Mechanism of dinitrochlorobenzene-induced dermatitis in mice: role of specific antibodies in pathogenesis//PLoS One. 2009;4(11)].

На 0 и 12 сутки исследования самцам мышей линии Balb/c на выбранные участки спины наносили 100 мкл 2%-ного раствора 1-хлор-2,4-динитробензола (ДНХБ, Sigma-Aldrich, США), приготовленного на 95%-ном растворе этанола. На 17 сутки исследования на правое "опытное" ухо животным наносили 20 мкл 2%-ного спиртового раствора ДНХБ дважды с интервалом 1 ч. Исследуемое соединение и препарат сравнения дексаметазон вводили животным внутрижелудочно один раз в сутки на 8-17 сутки исследования.

На 18 сутки эксперимента животных эвтаназировали в CO₂-камере. Определяли массу "опытного" и "контрольного" уха. Вычисляли индекс реакции (ИР), выраженный в процентах разницы в массах "опытного" и "контрольного" уха.

Проведенное исследование показало, что соединения общей формулы (I) снижают индекс реакции на экспериментальной модели атопического дерматита. По выраженности действия заявляемые соединения не уступают стероидному препарату дексаметазону (табл. 13).

Таблица 13

Индекс реакции atopического дерматита у мышей ($M \pm m$, $n=8$)

Группа	Индекс реакции (%)
Интakтные	$-0,49 \pm 0,68$
Контроль	$93,8 \pm 5,4^*$
Соединение 1 (0,3 мг/кг)	$74,4 \pm 7,3^* \&$
Соединение 1 (3 мг/кг)	$69,5 \pm 8,2^* \&$
Соединение 1 (30 мг/кг)	$69,1 \pm 8^* \&$
Дексаметазон (10 мг/кг)	$65,6 \pm 8^* \&$

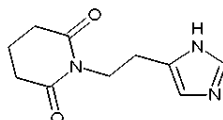
Примечание.

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$;& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Полученные результаты дают основание заключить, что на экспериментальных моделях эозинофилии, в частности сефадексиндуцированного эозинофильного воспаления легких у крыс, лейкотриениндуцированного эозинофильного воспаления легких у морских свинок, аллергического ринита и астмы у морских свинок, atopического дерматита у мышей и др., соединения общей формулы (I) существенно снижают эозинофилию.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

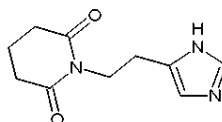
1. Способ лечения эозинофильных заболеваний, включающий введение пациенту эффективного количества соединения



или его фармацевтически приемлемой соли,

где эозинофильное заболевание представляет собой бронхиальную астму, аллергический ринит, полипозные риносинусопатии, эозинофильный колит, эозинофильный синдром, аллергический конъюнктивит, atopический дерматит, синдром Черджа-Стросса, анафилактический шок, отек Квинке, эозинофильный васкулит, эозинофильный эзофагит, эозинофильный гастроэнтерит или фиброзы.

2. Применение соединения



или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения эозинофильных заболеваний,

где эозинофильное заболевание представляет собой бронхиальную астму, аллергический ринит, полипозные риносинусопатии, эозинофильный колит, эозинофильный синдром, аллергический конъюнктивит, atopический дерматит, синдром Черджа-Стросса, анафилактический шок, отек Квинке, эозинофильный васкулит, эозинофильный эзофагит, эозинофильный гастроэнтерит или фиброзы.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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