

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201892640 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.04.30

(51) Int. Cl. *A61K 31/44* (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.06.02

(54) ЛЕЧЕНИЕ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

(31) 201621019087; 201621019185

(32) 2016.06.02

(33) IN

(86) PCT/IN2017/050224

(87) WO 2017/208267 2017.12.07

(71) Заявитель:

САН ФАРМА АДВАНСЕД РЕСЕРЧ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (IN)

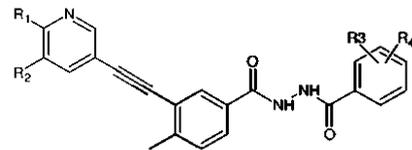
(72) Изобретатель:

Дамле Нитин Кришнаджи, Мандхане
Санджай Нандлалджи, Упадхя
Манодж Атмарамджи, Мехетре
Самеер Вишванатх, Чхидревар
Гаджанан Уттамрао, Сенгупта
Прабал, Чхиттури Тринадха Рао (IN)

(74) Представитель:

Носырева Е.Л. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу лечения или предупреждения болезни Паркинсона у субъекта, включающему введение соединения формулы I



Формула I

где R₁ представляет собой -NHC(O)C₃₋₆циклоалкил и R₂ представляет собой водород; или R₁ и R₂ вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют шестичленное ароматическое кольцо, при этом кольцо замещено одной или более группами, выбранными из водорода, галогена и C₁₋₆алкила; R₃ и R₄ независимо выбраны из группы, включающей водород, галоген, C₁₋₃алкил, OC₁₋₃алкил, NO₂, SC₁₋₃алкил, C₁₋₃галогеналкил, OC₁₋₃галогеналкил и SC₁₋₃галогеналкил; или его фармацевтически приемлемой соли.

A1

201892640

201892640

A1

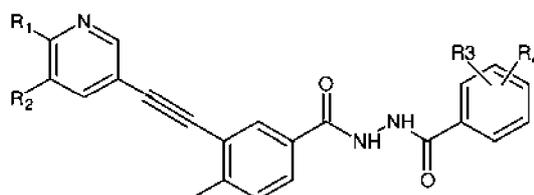
ЛЕЧЕНИЕ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании заявки на патент Индии № IN 201621019087, поданной 02 июня 2016 г., и IN 201621019185, поданной 02 июня 2016 г., которые включены в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к способу лечения или предупреждения болезни Паркинсона у субъекта, включающему введение соединения формулы I,



Формула I

где R_1 представляет собой $-NHC(O)C_{3-6}$ циклоалкил, и R_2 представляет собой водород;

или R_1 и R_2 вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют шестичленное ароматическое кольцо, при этом кольцо замещено одной или более группами, выбранными из водорода, галогена и C_{1-6} алкила;

R_3 и R_4 независимо выбраны из группы, включающей водород, галоген, C_{1-3} алкил, OC_{1-3} алкил, NO_2 , SC_{1-3} алкил, C_{1-3} галогеналкил, OC_{1-3} галогеналкил и SC_{1-3} галогеналкил; или его фармацевтически приемлемой соли.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

c-Abl представляет собой нерцепторную тирозиновую протеинкиназу, которая вовлечена в различные клеточные процессы, которые включают регуляцию клеточного выживания, роста и подвижности. Ингибиторы c-Abl-киназы, такие как иматиниб (Gleevec[®]), нилотиниб (Tasigna[®]), дазатиниб (Sprycel[®]) и понатиниб (Iclusig[®]), были разработаны и поступили в продажу для клинического применения в лечении хронического миелоидного лейкоза.

Недавние исследования продемонстрировали, что c-Abl выполняет важную роль в индуцированной оксидативным стрессом гибели нервных клеток (Wu et al., Cell Death Differ., 2016; 23:542-552). Сообщалось, что c-Abl участвует в развитии болезни Паркинсона (Gonfloni et al., Int. J. Cell Biol., 2012; 2012:1-7). Также известно, что c-Abl активируется дофаминергическим стрессом и дофаминергическими нейротоксинами, так например 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (MPTP, который под воздействием ферментов *in vivo* превращается в его активную форму MPP⁺) вызывает фосфорилирование тирозина в паркине, что влечет за собой потерю паркином его активности как E3-лигазы. Это приводит к накоплению разных субстратов паркина и в конечном итоге к гибели дофаминергических нейронов (Ko et al., PNAS, 2010; 107:16691-16696).

Болезнь Паркинсона (PD) является распространенным нейродегенеративным заболеванием, характеризующимся накоплением белка во внутриклеточных включениях, называемых тельцами Леви и невритами Леви, и последующей утратой дофаминергических нейронов. Редкие семейные мутации дали представление об этом хроническом, прогрессирующем нейродегенеративном заболевании, например, мутации в α -синуклеине и LRRK2 вызывают развитие аутосомно-доминантной формы PD, а мутации в DJ-1, PINK1 и паркине приводят к развитию аутосомно-рецессивной формы PD. Паркин представляет собой E3-

убиквитин-лигазу, и предполагается, что семейные мутации нарушают активность паркина как E3-лигазы (Ko et al., PNAS, 2010; 107:16691-16696).

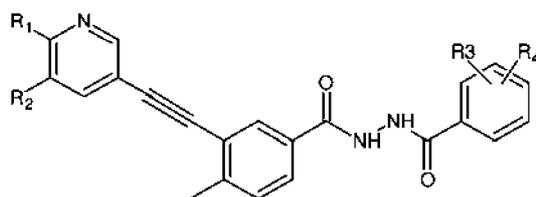
Показано, что c-Abl контролирует разрушение двух белков, вовлеченных в патогенез PD, а именно паркина и α -синуклеина (Mahul-Mellier et al., Hum. Mol. Genet., 2014; 23:2858-2879). c-Abl фосфорилирует паркин по тирозину 143. Такое фосфорилирование ингибирует активность паркина как E3-убиквитин-лигазы, что приводит к накоплению AIMP2 и FBP1 (субстраты паркина) и утрате паркином его цитопротекторной функции, вызывающих гибель клеток (Ko et al., PNAS, 2010; 107:16691-16696; Imam et al., J. Neurosci., 2011; 31:157-163). В дополнение к этому c-Abl контролирует клиренс α -синуклеина, синаптического белка, который в значительной мере вовлечен в патогенез PD. Описана двунаправленная взаимосвязь между α -синуклеином и c-Abl *in vivo*, где повышение экспрессии α -синуклеина способствует фосфорилированию и последующей активации c-Abl. И наоборот, повышение экспрессии и активация c-Abl приводит к накоплению и агрегации α -синуклеина, согласно чему можно предположить, что ингибирование c-Abl может представлять собой жизнеспособную стратегию защиты дофаминергических нейронов от токсического воздействия накопленного α -синуклеина при PD (Hebron et al., Hum. Mol. Genet., 2013; 22:3315-3328; Hebron et al., Autophagy, 2013; 9:1249-1250).

Известно, что такие ингибиторы c-Abl, как нилотиниб, проникают через гематоэнцефалический барьер и защищают дофаминергические нейроны в мышинной модели PD, индуцированного 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (в данном документе называемым MPTP) (Kagurragounder et al., Sci. Rep. 2014; 4:4874). Показано, что нилотиниб усиливает клиренс α -синуклеина по пути аутофагии и защищает от индуцированной накоплением α -синуклеина потери дофаминергических нейронов в данной мышинной модели PD (Hebron et al., Hum. Mol. Genet., 2013; 22:3315-3328; Imam et al., J. Neurosci., 2011; 31:157-163). Кроме того, в US20150087653 раскрыт способ лечения

нейродегенеративных заболеваний, включающий введение ингибиторов тирозинкиназ, таких как нилотиниб. Однако нилотиниб характеризуется несколькими существенными неблагоприятными эффектами, связанными с лекарственным средством. USFDA выпустило особое предупреждение в отношении капсул Tasisign[®], поскольку их применение для лечения связано с потенциально тяжелыми побочными эффектами со стороны сердца (удлинение интервала QT) и случаями скорострительной смерти пациентов. Известно, что дазатиниб вызывает плевральный выпот и кровотечение. Понатиниб также связан с тяжелыми неблагоприятными эффектами, которые включают тромбоэмболию и закупорку сосудов. Иматиниб не является сильным ингибитором Abl-киназы. Более того, как для иматиниба, так и для дазатиниба, являющихся субстратом Р-гликопротеина (p-gp), показана низкая концентрация в мозге. Таким образом, существует потребность в сильном ингибиторе Abl-киназы, который может проникать через гематоэнцефалический барьер и не вызывает побочных эффектов со стороны сердечно-сосудистой системы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение предусматривает способ лечения или предупреждения болезни Паркинсона у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения формулы I,



Формула I

где R₁ представляет собой -NHC(O)C₃₋₆циклоалкил, и R₂ представляет собой водород;

или R_1 и R_2 вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют шестичленное ароматическое кольцо, при этом кольцо замещено одной или более группами, выбранными из водорода, галогена и C_{1-6} алкила;

R_3 и R_4 независимо выбраны из группы, включающей водород, галоген, C_{1-3} алкил, OC_{1-3} алкил, NO_2 , SC_{1-3} алкил, C_{1-3} галогеналкил, OC_{1-3} галогеналкил и SC_{1-3} галогеналкил; или его фармацевтически приемлемой соли.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1. Микрофотоснимки коронарных срезов, на которых показаны нейроны, положительные по тирозингидроксилазе (ТН), демонстрирующие предупреждение нейродегенерации с помощью соединения формулы I.a.

Фиг. 2. Процентное значение площади ТН-положительных нейронов при введении соединения формулы I.a.

Фиг. 3. Интегральная плотность ТН-иммунореактивности при введении соединения формулы I.a.

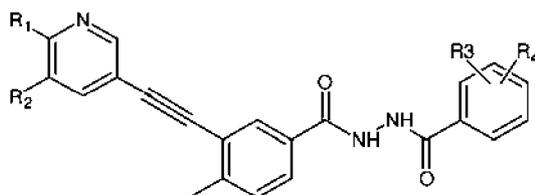
Фиг. 4. Микрофотоснимки коронарных срезов, на которых показаны нейроны, положительные по тирозингидроксилазе (ТН), демонстрирующие предупреждение нейродегенерации с помощью соединения формулы I.b.

Фиг. 5. Процентное значение площади ТН-положительных нейронов при введении соединения формулы I.b.

Фиг. 6. Интегральная плотность ТН-иммунореактивности при введении соединения формулы I.b.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ лечения или предупреждения болезни Паркинсона у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения формулы I,



Формула I

где R₁ представляет собой -NHC(O)C₃₋₆циклоалкил, и R₂ представляет собой водород;

или R₁ и R₂ вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют шестичленное ароматическое кольцо, при этом кольцо замещено одной или более группами, выбранными из водорода, галогена и C₁₋₆алкила;

R₃ и R₄ независимо выбраны из группы, включающей водород, галоген, C₁₋₃алкил, OC₁₋₃алкил, NO₂, SC₁₋₃алкил, C₁₋₃галогеналкил, OC₁₋₃галогеналкил и SC₁₋₃галогеналкил; или его фармацевтически приемлемой соли.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ лечения или предупреждения болезни Паркинсона у субъекта, включающий выбор субъекта, страдающего болезнью Паркинсона или подверженного риску развития болезни Паркинсона, и введение терапевтически эффективного количества соединения формулы I.

Выражение «терапевтически эффективное количество соединения формулы I», применяемое в данном документе, относится к количеству соединения формулы I, которое вызывает терапевтический эффект, для достижения которого его вводят.

Термин «алкил» относится к радикалу с насыщенной углеводородной цепью, который в остове содержит только атомы углерода и водорода, либо к линейному, либо разветвленному, и который присоединен к остальной части молекулы посредством одинарной связи, например, к метилу, этилу, н-пропилу, 1-метилэтилу (изопропилу), н-бутилу и н-пентилу.

Цифры в таком выражении, как «C₁₋₆алкил», означают, что в алкильной цепи присутствует от 1 до 6 атомов углерода.

Термин «C₃₋₆циклоалкил» относится к неароматической моноциклической кольцевой системе с 3-6 атомами углерода. Моноциклические кольца включают циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил.

Термин «галогеналкил» относится к алкильной цепи, замещенной одним или более радикалами, представляющими собой галоген, выбранными из хлорида, бромида, йодида и фторида.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения или предупреждения болезни Паркинсона, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения формулы I, где R₁ в соединении формулы I представляет собой –NHС(О)циклопропил, и R₂ представляет собой водород.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения или предупреждения болезни Паркинсона, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения формулы I, где R₁ и R₂ в соединении формулы I вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют шестичленное ароматическое кольцо, где кольцо замещено одной или более группами, выбранными из водорода, галогена и C₁₋₆алкила. Предпочтительно ароматическое кольцо замещено водородом, т. е. является незамещенным.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения или предупреждения болезни Паркинсона, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения формулы I, где R₁ и R₂ в соединении формулы I вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют шестичленное ароматическое кольцо, где кольцо замещено водородом, т. е. является незамещенным, и R₃ представляет собой хлор, а R₄ представляет собой метил и присутствуют в качестве заместителей в положении 2 и 6 в кольце.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения или предупреждения болезни Паркинсона, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения формулы I, где R₃ и R₄ в соединении формулы I выбраны из галогена и C₁₋₆алкила. В предпочтительном варианте осуществления R₃ и R₄ представляют собой галоген и метил и присутствуют в качестве заместителей в положении 2 и 6 в кольце.

Химические названия некоторых предпочтительных соединений формулы I представлены ниже в таблице 1.

Таблица 1

№ соединения	Химическое название
I.a	<i>N'</i> -(2-Хлор-6-метилбензоил)-4-метил-3-[2-(3-хинолил)этинил]-бензогидразид
I.b	(5-{5-[<i>N'</i> -(2-Хлор-6-метилбензоил)гидразинкарбонил]-2-метилфенилэтинил}-пиридин-2-ил)амид циклопропанкарбоновой кислоты
I.c	(5-{5-[<i>N'</i> -(2-Хлор-6-метилбензоил)гидразинкарбонил]-2-метил-фенилэтинил}-пиридин-2-ил)амид циклогексанкарбоновой кислоты
I.d	(5-{5-[<i>N'</i> -(2-Хлор-6-метилбензоил)гидразинкарбонил]-2-метил-фенилэтинил}-пиридин-2-ил)амид

	циклобутанкарбоновой кислоты
I.e	<i>N'</i> -(2-Хлор-6-метилбензоил)-4-метил-3-[2-(6-хлор-3-хинолил)этинил]-бензогидразид
I.f	<i>N'</i> -(2-Хлор-6-метилбензоил)-4-метил-3-[2-(6-метил-3-хинолил)этинил]-бензогидразид
I.g	<i>N'</i> -(2-Хлор-6-метилбензоил)-4-метил-3-[2-(6-фтор-3-хинолил)этинил]-бензогидразид

Подходящими фармацевтически приемлемыми солями соединения согласно настоящему изобретению могут быть соли неорганических кислот, таких как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, ортофосфорная кислота и т. п., или органических кислот, таких как, например, уксусная кислота, бензолсульфоновая кислота, метансульфоновая кислота, бензойная кислота, лимонная кислота, гликолевая кислота, молочная кислота, фумаровая кислота, янтарная кислота, адипиновая кислота, пимелиновая кислота, субериновая кислота, азелаиновая кислота, яблочная кислота, винная кислота, или аминокислот, таких как глутаминовая кислота или аспарагиновая кислота и т. п. Один или более атомов водорода соединения формулы I могут быть дейтерированными, т. е. замещенными атомом дейтерия.

В публикации WIPO WO2012098416 ('публикация 416') раскрыта группа Маркуша из соединений, активных в качестве ингибиторов c-Abl-киназы, и их полезность при лечении таких видов рака, как хронический миелоидный лейкоз (CML). Соединения формулы I по настоящему изобретению можно получить способами, описанными в WO2012098416 и WO2016185490, которые включены в данный документ посредством ссылки.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что соединения формулы I по настоящему изобретению являются сильными ингибиторами Abl-киназы и

успешно проникают через гематоэнцефалический барьер, в результате чего эффективно достигается высокое соотношение концентраций соединения формулы I в мозге и в плазме и высокий терапевтический индекс.

В частности, авторы настоящего изобретения обнаружили, что соединение формулы I в терапевтически эффективной дозе не вызывает побочных эффектов со стороны сердечно-сосудистой системы при его тестировании в отношении влияния *in vitro* на канал hERG и его влияния *in vivo* на параметры ECG, такие как интервал QT, интервал QT_c, интервал QT_{cf}, и частоту сердечных сокращений у собак породы бигль в состоянии бодрствования и морских свинок. Обнаружено, что соединение формулы I является безопасным, поскольку оно не оказывает никакого ненадлежащего влияния на параметры ECG и частоту сердечных сокращений, как описано в данном документе в примерах.

Соединение формулы I можно вводить перорально в виде подходящей лекарственной формы. Подходящая лекарственная форма может включать таблетку, пеллеты, капсулу, саше, пеллеты в саше, пеллеты в капсуле, порошок, гранулы и т. п. Соединение формулы I может быть составлено в лекарственную форму для перорального применения, которая может содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, обычно хорошо известные специалисту в данной области. Фармацевтически приемлемые носители, которые можно применять для получения подходящей лекарственной формы, раскрыты в «Remington's Pharmaceutical Sciences», шестнадцатое издание, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Истон, Пенсильвания, 1980 г.).

Следующие примеры служат для иллюстрирования настоящего изобретения без ограничения настоящего изобретения по его объему.

ПРИМЕР 1

Ингибирование Abl-киназы

В конечной реакционной смеси объемом 25 μ л Abl (человека) (5-10 мЕд) инкубировали с использованием 8 мМ MOPS с pH 7,0, 0,2 мМ EDTA, 50 μ М EAUYAAPFAKKK, 10 мМ Mg(OAc)₂ и [γ -³³P-АТР] [удельная активность приблизительно 500 число импульсов в минуту/пмоль, концентрация в соответствии с требованиями). Реакцию инициировали посредством добавления смеси MgАТР. После инкубирования в течение 40 минут при комнатной температуре реакцию останавливали посредством добавления 5 мкл 3 % раствора ортофосфорной кислоты. Затем 10 мкл реакционной смеси помещали в P30 Filtermat и промывали три раза в течение 5 минут в 75 мМ ортофосфорной кислоте и один раз в метаноле перед высушиванием и подсчетом импульсов.

Результаты для представленных соединений формулы I приведены в таблице 2.

Таблица 2. Сравнительные показатели активности ингибиторов тирозинкиназ в отношении c-Abl

IC ₅₀ (нМ)					
I.a	I.b	Нилотиниб	Понатиниб	Дазатиниб	Иматиниб
0,9	0,6	18	0,4	0,27	190

ПРИМЕР 2

Фармакокинетические исследования в мозге и плазме

Чтобы определить, проникает ли соединение формулы I.a через гематоэнцефалический барьер, мышам линии C57BL6 перорально вводили 30 мг/кг соединения формулы I.a, 100 мг/кг нилотиниба или 30 мг/кг дазатиниба. В

моменты времени 1, 4 и 8 часов после обработки мышей анестезировали изофлураном и проводили забор 0,4 мл крови из ретроорбитального сплетения в пробирки фирмы «Эппендорф», содержащие 8 мкл гепарина натрия в качестве противосвертывающего средства (100 МЕ/мл), и переносили в контейнеры со льдом. Образцы крови немедленно центрифугировали в течение 7 мин. при 8500 об./мин., 4°C. Плазму отделяли в предварительно маркированные пробирки фирмы «Эппендорф» и хранили при -70°C до следующего анализа. Непосредственно после этого мышей умерщвляли, мозг целиком извлекали и ополаскивали с помощью охлажденного льдом фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) для удаления периферической крови и высушивали путем промокания. Образцы ткани мозга взвешивали и гомогенизировали в объеме PBS в соотношении 1:2 с применением гомогенизатора для тканей и хранили в маркированных флаконах при -70°C до следующего анализа. Концентрации соединения формулы I.a в мозге и плазме определяли с применением методики LC-MS.

Было обнаружено, что соотношение концентрации в мозге и концентрации в плазме было значительно выше для соединения формулы I.a, по сравнению с таковым для нилотиниба или дазатиниба (см. таблицу 3).

Таблица 3 Концентрация соединений в мозге и в плазме.

Соединения	Обработка* (мг/кг)	Моменты времени (час)	Концентрация в плазме (нг соединения/мл плазмы)	Концентрация в мозге (нг соединения/г ткани мозга)	Соотношение концентрация в мозге/концентра ция в плазме
Соединение формулы I.a	30	1	4798 ± 858	1901 ± 959	0,40
		4	3167 ± 50	510 ± 367	0,16
		8	2715 ± 379	435 ± 157	0,16
Нилотиниб	100	1	31683 ± 7958	380 ± 70	0,01
		4	38813 ± 11635	487 ± 126	0,01
		8	16988 ± 2133	180 ± 46	0,01
Дазатиниб	30	1	553 ± 550	23,4 ± 0	0,04
		4	222 ± 122	25 ± 5	0,11
		8	BQL	24 ± 4	-

BQL - ниже предела количественного определения

ПРИМЕР 3

Эффективность соединения формулы I.a в животной модели болезни Паркинсона

Мышам линии C57BL/6 (возрастом 6-8 недель, с массой тела 25-30 г) перорально, с применением носителя вводили соединения формулы I.a (10 или 30 мг/кг, один раз в сутки) в течение 7 дней. На 7-ой день эти животные получали четыре внутривентрикулярные инъекции нейротоксина, 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (MPTP-HCl; 17 мг/кг в пересчете на свободное основание;

Sigma), в солевом растворе с интервалами по 2 часа. Ежедневное введение дозы соединения продолжали в течение 7 дополнительных дней после последней инъекции МРТР. Вкратце, соединение вводили 6 дней до введения МРТР, в день введения МРТР и 7 дней после введения МРТР. Всех животных умерщвляли через 7 дней после введения МРТР и ткани мозга обрабатывали для иммуногистохимической оценки. Для иммуногистохимического обнаружения тирозингидроксилазы (ТН) применяли стандартный авидин-биотиновый метод (Benno et al., Brain Res., 1982; 246:225-236). На начальном этапе с применением криостата делали срезы мозга на уровне компактной части черного вещества (SNPc) и помещали на предметные стекла. Предметные стекла со срезами мозга промывали 3x5 минут в 0,1 М PBS. Срезы сначала инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре с нормальной блокирующей сывороткой в 0,1 М PBS с 0,3% Triton X-100 и в течение еще 2 часов с кроличьими поликлональными антителами к мышинной тирозингидроксилазе (Invitrogen), разбавленными в соотношении 1:1000 в 0,1 М PBS с нормальной блокирующей сывороткой. Предметные стекла со срезами дополнительно промывали 3x5 минут в 0,1 М PBS и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре с биотинилированными антителами к иммуноглобулину кролика (набор ABC фирмы Vectastain[®]). Срезы ополаскивали 3x5 минут в 0,1 М PBS и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре с растворами А и В (набор ABC фирмы Vectastain[®]), разбавленными в соотношении 1:50 в 0,1 М PBS. Через 1 час срезы промывали 3x5 минут в 0,1 М PBS и инкубировали в растворе 3,3'-диаминобензидин (DAB)/H₂O₂ (Sigma) в течение приблизительно 5-8 минут (за ходом процесса наблюдали под микроскопом на предмет оптимального соотношения сигнал/шум). Срезы сначала промывали 2x5 минут в 0,1 М PBS и затем 3x5 минут в воде качества Milli-Q. Предметные стекла накрывали покровными стеклами с добавлением глицерин-желатинового раствора и выдерживали при комнатной температуре в течение ночи для высушивания, после чего получали изображения окрашенных срезов мозга с применением

присоединенной к микроскопу камеры и анализировали с применением программного обеспечения NIH ImageJ[®] (NIH, Бетесда, Мэриленд). Для осуществления анализа изображения преобразовывали до 8-битового разрешения и оптимальных яркости/контраста. На отдельных изображениях удаляли фоновые и ложные сигналы и проводили измерение площади, покрытой клеточными телами и волокнами. Рассчитывали процент данной области относительно общей площади изображения и интегральную плотность. Для определения наличия какой-либо межгрупповой или внутригрупповой изменчивости и статистической значимости полученные результаты сравнивали с применением GraphPad Prism[®] 6.0. Пероральное введение соединения формулы I.a в значительной степени препятствовало индуцированной MPTP нейродегенерации, как видно из микрофотоснимков коронарных срезов, на которых видны TH-положительные нейроны (фиг. 1), определения процента площади TH-положительных нейронов (фиг. 2) и интегральной плотности TH-иммунореактивности (фиг. 3).

ПРИМЕР 4

Эффективность соединения формулы I.b в животной модели болезни Паркинсона

Эффективность соединения формулы I.b в отношении лечения болезни Паркинсона тестировали тем же способом, который описан для соединения формулы I.a в примере 3 выше.

Для определения наличия какой-либо межгрупповой или внутригрупповой изменчивости и статистической значимости полученные результаты сравнивали с применением GraphPad Prism[®] 6.0. Пероральное введение соединения формулы I.b в значительной степени препятствовало индуцированной MPTP нейродегенерации, как видно из микрофотоснимков коронарных срезов, на которых видны TH-положительные нейроны (фиг. 4), определения процента площади TH-

положительных нейронов (фиг. 5) и интегральной плотности ТН-иммунореактивности (фиг. 6).

ПРИМЕР 5

Электрофизиологические процедуры - влияние на K^+ -канал hERG

Соединение формулы I.a и I.b тестировали на безопасность для сердечно-сосудистой системы в ходе теста *in vitro* для определения ингибирования K^+ -канала hERG. В тестируемой концентрации соединения формулы I.a и I.b не демонстрировали какой-либо значимой величины ингибирования тока hERG.

Исследовали влияние *in vitro* соединений формулы I.a и I.b на ионные токи в эмбриональных клетках почки человека (HEK293), стабильно экспрессирующих ген ether-à-go-go человека (hERG), к которым были подсоединены электроды для фиксации потенциала. Тестировали две концентрации соединений формулы I.a и I.b (1 и 10 мкМ) при температуре, близкой к физиологической.

Клетки переносили в камеру регистрации сигналов и заливали контрольным раствором, представляющим собой среду-носитель (HEPES-забуференный физиологический солевой раствор + 1% диметилсульфоксида + 1% альбумина бычьей сыворотки). Раствор для заполнения микропипетки для записи результатов локальной фиксации потенциала целой клетки состоял из: аспартата калия, 130 мМ; $MgCl_2$, 5 мМ; EGTA, 5 мМ; АТФ, 4 мМ; HEPES, 10 мМ; pH регулировали до значения 7,2 с помощью 10 н. КОН. Раствор для заполнения микропипетки получали отдельными сериями, делили на аликвоты, хранили в замороженном состоянии и каждый день размораживали свежую аликвоту. Запись результатов проводили при температуре от 33 до 35°C с применением комбинации напрямую подключенных встроенного устройства для предварительного нагрева раствора, нагревательного устройства камеры и регулятора температуры с обратной связью. Температуру измеряли в камере регистрации сигналов с применением датчика

терморезистора. Микропипетки для записи результатов фиксации потенциала изготавливали из стеклянных капиллярных трубок с применением устройства для вытягивания микропипеток P-97 (Sutter Instruments, Новато, Калифорния). Для записи результатов измерений с целых клеток применяли серийный усилитель для локальной фиксации потенциала. Перед оцифровкой записи результатов измерения тока обрабатывали с помощью фильтра низких частот на уровне одной пятой от выборочной частоты.

Клетки, стабильно экспрессирующие hERG, поддерживали при -80 мВ. Начальный ток и ток при ингибировании калиевого тока через канал hERG в состоянии покоя, обусловленный тестируемыми соединениями (формула I.a и I.b), измеряли с применением последовательности импульсов с фиксированными амплитудами (подготовительный импульс для приведения в заданное состояние +20 мВ в течение 1 с; реполяризующее тестовое изменение до -80 мВ (-0,5 В/с), повторяющееся с интервалами 5 с). Для оценки вклада эндогенных токов каждую запись результатов измерения заканчивали финальным внесением сверхмаксимальной концентрации вещества сравнения (E-4031, 500 нМ). Чтобы определить эффективность тестируемых соединений в отношении ингибирования канала hERG из полученных данных вычитали остающийся неингибированным ток в цифровом формате в автономном режиме.

Соединение формулы I.a ингибировало ток через канал hERG на (среднее значение \pm SEM) $2,1 \pm 0,4\%$ при 1 мкМ ($n = 3$) и на $9,7 \pm 0,4\%$ при 10 мкМ ($n = 3$) по сравнению с $1,0 \pm 0,6\%$ ($n = 3$) в случае контроля, представляющего собой среду-носитель (см. таблицу 4). Концентрации соединения формулы I.a выше 10 мкМ не тестировали в связи с пределом растворимости соединения в контроле, представляющем собой среду-носитель. При подобных условиях положительный контроль (терфенадин, 60 нМ) ингибировал калиевый ток через канал hERG на (среднее значение \pm SD; $n = 2$) $82,8 \pm 1,2\%$, подтверждая наличие слабого эффекта соединения формулы I.a при его очень высокой концентрации в отношении K^+ -

канала hERG. Для сравнения, нилотиниб демонстрирует приблизительно 90% ингибирование при концентрации 1 мкМ (таблица 5).

Таблица 4. Среднее процентное значение ингибирования тока через канал hERG при каждой концентрации соединения формулы I.a и I.b.

Соединение	Концентрация (мкМ)	Среднее значение	SD	SEM	N
Соединение I.a	0	1,0%	1,0%	0,6%	3
	1	2,1%	0,7%	0,4%	3
	10	9,7%	0,7%	0,4%	3
Соединение I.b	0	1,6%	0,3%	0,2%	3
	0,3	5,6%	1,3%	0,8%	3
	1	12,9%*	4,1%	2,4%	3
	3	25,0%*	6,0%	3,4%	3

* Значение статистически отличается от значения, полученного отдельно для среды-носителя.

Таблица 5. Процентное значение ингибирования тока через канал hERG нилотинибом[#]

Конц. (мкМ)	0,03	0,1	0,3	1
% ингибирования	14,9 ± 2	43,9 ± 0,7	70,4 ± 2,5	89,7 ± 1,6

[#] Данные фармакологического обзора CDER по NDA № 22-068 (капсула Tasigna[®]), ст. № 31

ПРИМЕР 6

Влияние соединения формулы I.a на интервалы QT, QT_{сб} и частоту сердечных сокращений у собак породы бигль в состоянии бодрствования

Соединение формулы I.a подвергали тестированию *in vivo* для определения его влияния на интервалы QT, QT_{сб} и QT_{сf} и частоту сердечных сокращений у собак породы бигль в состоянии бодрствования.

Соединение формулы I.a вводили пероральным путем (p.o.) на трех уровнях дозирования, 5, 15 и 30 мг/кг, самцам и самкам собак породы бигль, регистрацию состояния которых проводили дистанционно в состоянии бодрствования. Рвота возникла у двух животных (1 самец и 1 самка), которых обрабатывали с применением соединения формулы I.a дозовой группы 30 мг/кг, через 14 мин. после введения дозы. Следовательно, группу, которую обрабатывали с применением дозы 30 мг/кг, при анализе данных не рассматривали. При применении доз 5 и 15 мг/кг рвота не наблюдалась.

Измерения параметров ECG (интервал QT, интервал QT_{сб}, интервал QT_{сf}) и частоты сердечных сокращений проводили и записывали в течение 2 часов до введения лекарственного средства (исходный уровень) и непрерывно в течение не более 24 часов после введения. Каждое животное получало как среду-носитель (плацебо), так и три разные дозы соединения формулы I.a в разные дни по схеме латинского квадрата с периодом отмычки минимум 96 ч. Чтобы получить фармакокинетические (PK) параметры в отдельный день проводили одно дополнительное пероральное введение дозы соединения формулы I.a для оценки концентраций соединения формулы I.a в плазме в разные моменты времени.

Данные по параметрам ECG (интервал QT, интервал QT_{сб}, интервал QT_{сf}) и частоте сердечных сокращений статистически сравнивали следующим образом. Данные группы плацебо в моменты времени 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 и 24 часа

сравнивали с исходными данными той же группы. Данные разных групп, лечение которых осуществляли с применением соединения формулы I.a, сравнивали с соответствующими данными группы плацебо.

Анализ ECG на основе объединенных данных самцов и самок собак указал на то, что по сравнению с исходным уровнем лечение с применением плацебо не оказывало статистически значимого влияния ни на один из параметров ECG (интервал QT, интервал QT_{cb}, интервал QT_{cf}), ни на частоту сердечных сокращений. Соединение формулы I.a в дозах 5 и 15 мг/кг не оказывало влияния на интервалы времени QT, QT_{cb}, QT_{cf} по сравнению с плацебо. Кроме того, другой параметр, такой как частота сердечных сокращений, оставался неизменным.

В PK-анализе продемонстрировано дозозависимое системное воздействие соединения формулы I.a на животных, которым вводили разные дозы соединения формулы I.a. Значение AUC_{0-inf} находилось в диапазоне от 1925 до 4824, от 6776 до 12756 и от 25927 до 46749 ч.×нг/мл при применении соединения формулы I.a в дозах 5, 15 и 30 мг/кг соответственно. Значение C_{max} находилось в диапазоне от 1218 до 2033, от 2723 до 5323 и от 9825 до 9967 нг/мл при применении соединения формулы I.a в дозах 5, 15 и 30 мг/кг соответственно.

Результаты данного исследования указывают на то, что однократное пероральное введение соединения формулы I.a в дозе не более 15 мг/кг не оказывает влияния на функции сердечно-сосудистой системы у собак породы бигль в состоянии бодрствования. Изменения в морфологии ECG отсутствовали при любом уровне дозы соединения формулы I.a. Отличия между полами в отношении влияния лечения на параметры ECG и частоту сердечных сокращений отсутствовали.

ПРИМЕР 7

Влияние соединения формулы I.b на интервалы QT, QTc и частоту сердечных сокращений у морской свинки под наркозом

Влияние соединения формулы I.b на интервалы QT, QTc и частоту сердечных сокращений изучали на морских свинках под наркозом.

Самцов морской свинки линии Данкин-Хартли с массой тела в диапазоне 300-400 г анестезировали путем внутрибрюшинной инъекции уретана (1,5 г/кг). Осуществляли трахеотомию и животному позволяли дышать спонтанно на протяжении всего эксперимента. Левую яремную вену катетеризировали с применением полиэтиленового катетера, заполненного гепаринизированным солевым раствором (100 МЕ/мл), для введения лекарственного средства. Электроды помещали в положение отведения II и записывали исходную ECG.

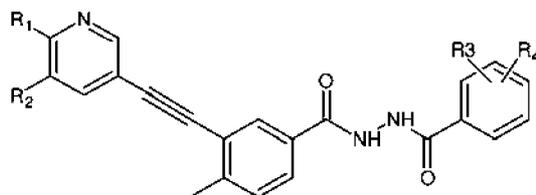
Для разных животных дозы соединения формулы I.b отвечивали в зависимости от массы тела и готовили в 0,5 мл DMSO, а затем вводили путем медленной внутривенной инфузии в течение 10 мин. ECG записывали в ходе инфузии, длящейся не более 0,5 ч., и после ее завершения. Интервалы QT и RR измеряли с применением программного обеспечения PowerLab 4SP[®]. Данные анализировали на 1, 5 и 10 мин. в ходе инфузии и через 5, 10, 15 и 30 мин. после инфузии, рассчитывая среднее по 9 систолам.

При внутривенном введении соединения формулы I.b в дозе 1 мг/кг изменение интервалов QT отсутствовало.

Формула изобретения

Первоначально
поданная формула
изобретения

1. Способ лечения или предупреждения болезни Паркинсона, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения формулы I,



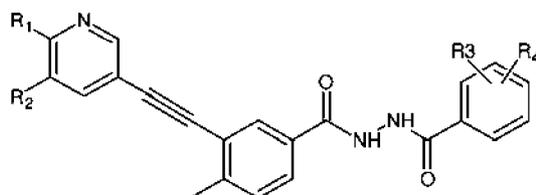
Формула I

где R_1 представляет собой $-NHC(O)C_{3-6}$ циклоалкил, и R_2 представляет собой водород;

или R_1 и R_2 вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют шестичленное ароматическое кольцо, при этом кольцо замещено одной или более группами, выбранными из водорода, галогена и C_{1-6} алкила;

R_3 и R_4 независимо выбраны из группы, включающей водород, галоген, C_{1-3} алкил, OC_{1-3} алкил, NO_2 , SC_{1-3} алкил, C_{1-3} галогеналкил, OC_{1-3} галогеналкил и SC_{1-3} галогеналкил.

2. Способ лечения или предупреждения болезни Паркинсона у субъекта, включающий выбор субъекта, страдающего болезнью Паркинсона или подверженного риску развития болезни Паркинсона, и введение терапевтически эффективного количества соединения формулы I,



Формула I

где R_1 представляет собой $-\text{NHC}(\text{O})\text{C}_{3-6}$ циклоалкил, и R_2 представляет собой водород;

или R_1 и R_2 вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют шестичленное ароматическое кольцо, при этом кольцо замещено одной или более группами, выбранными из водорода, галогена и C_{1-6} алкила;

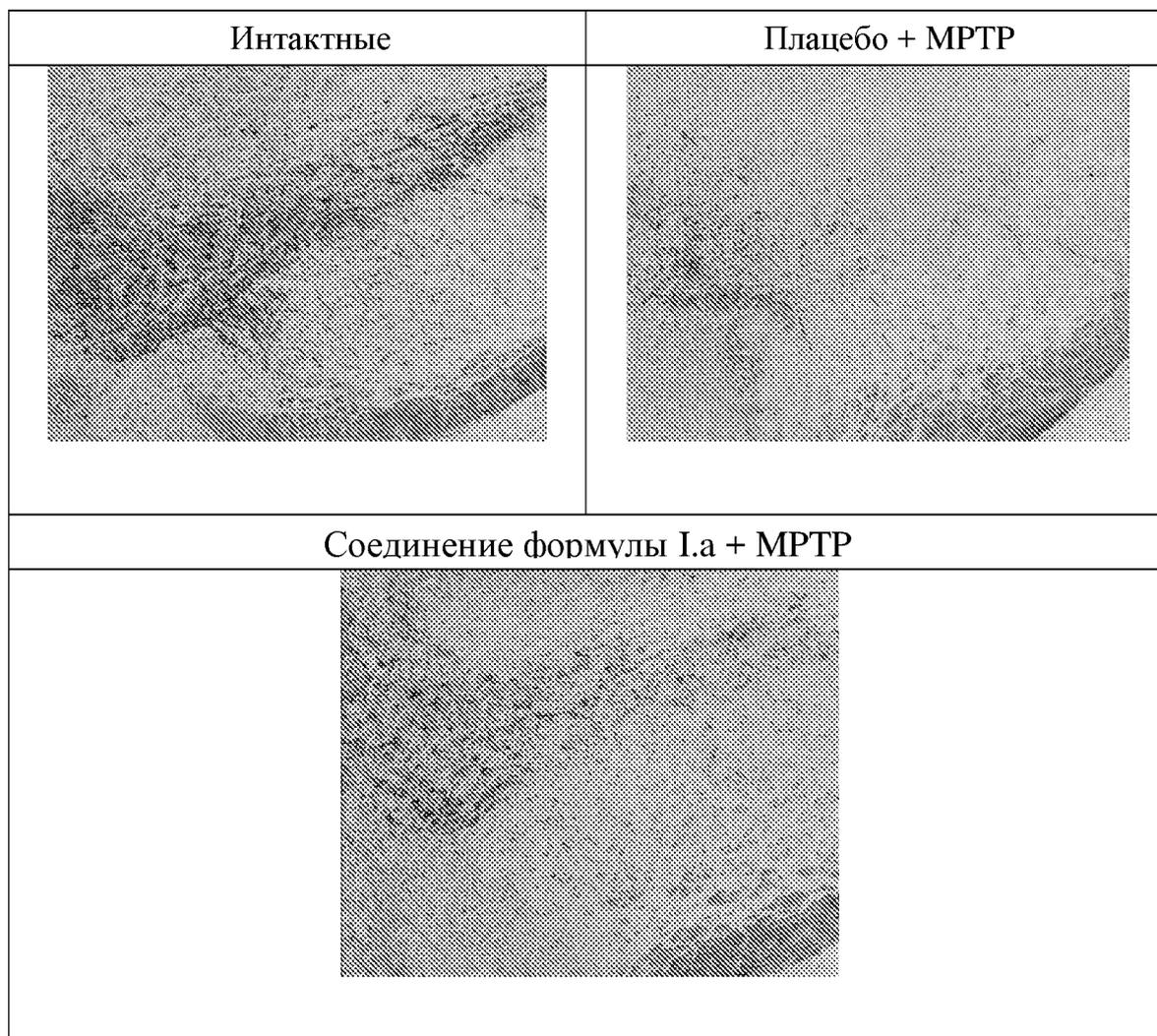
R_3 и R_4 независимо выбраны из группы, включающей водород, галоген, C_{1-3} алкил, OC_{1-3} алкил, NO_2 , SC_{1-3} алкил, C_{1-3} галогеналкил, OC_{1-3} галогеналкил и SC_{1-3} галогеналкил.

3. Способ лечения или предупреждения болезни Паркинсона по п. 1 и п. 2, где R_3 и R_4 в соединении формулы I выбраны из галогена и C_{1-3} алкила.

4. Способ лечения или предупреждения болезни Паркинсона по любому из предыдущих пунктов, где R_1 в соединении формулы I представляет собой $-\text{NHC}(\text{O})$ циклопропил, и R_2 представляет собой водород.

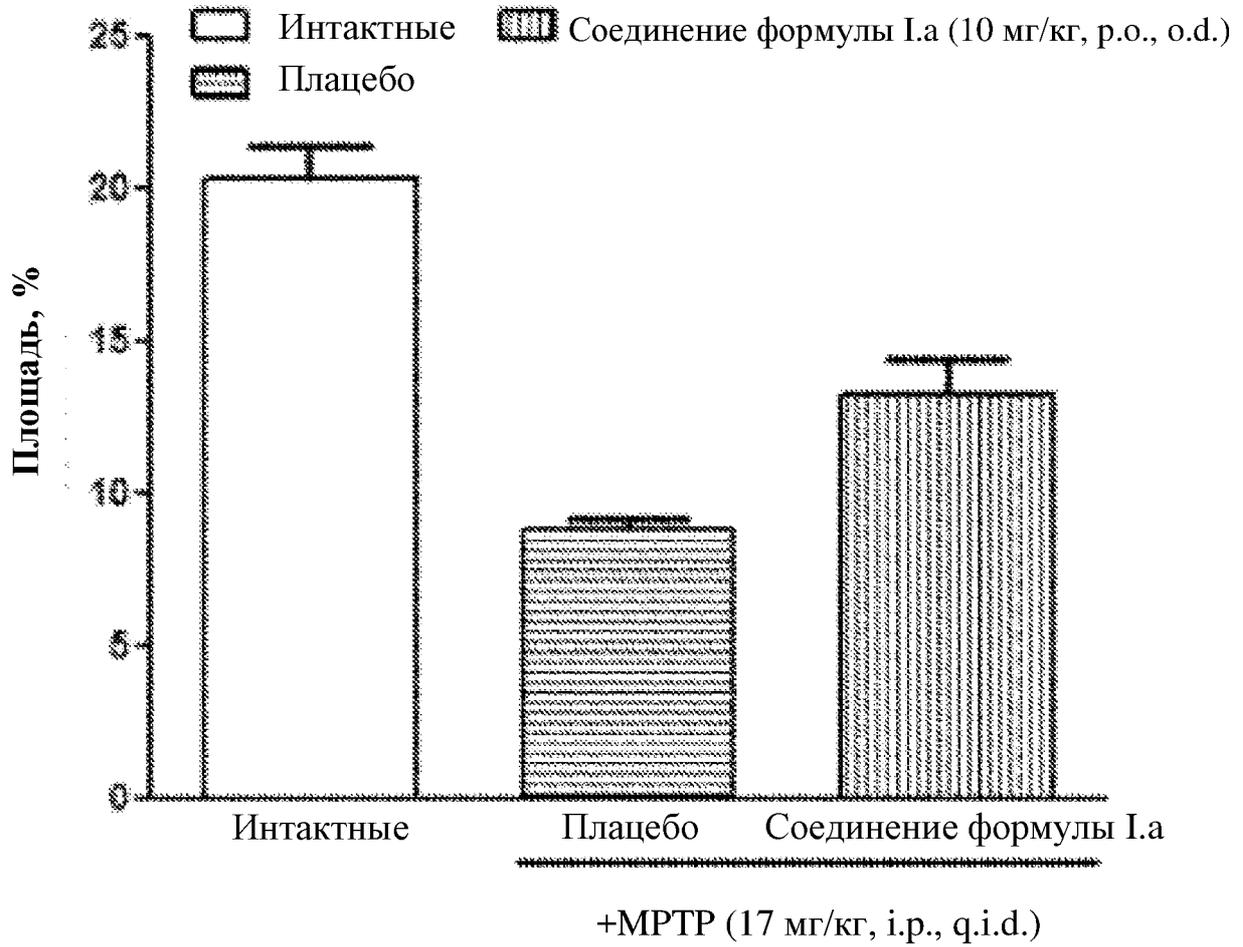
5. Способ лечения или предупреждения болезни Паркинсона по любому из предыдущих пунктов, где R_1 и R_2 в соединении формулы I вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют шестичленное ароматическое кольцо, при этом кольцо замещено одной или более группами, выбранными из водорода, галогена и C_{1-6} алкила.

Фиг. 1. Микрофотоснимки коронарных срезов, на которых показаны нейроны, положительные по тирозингидроксилазе (ТН)



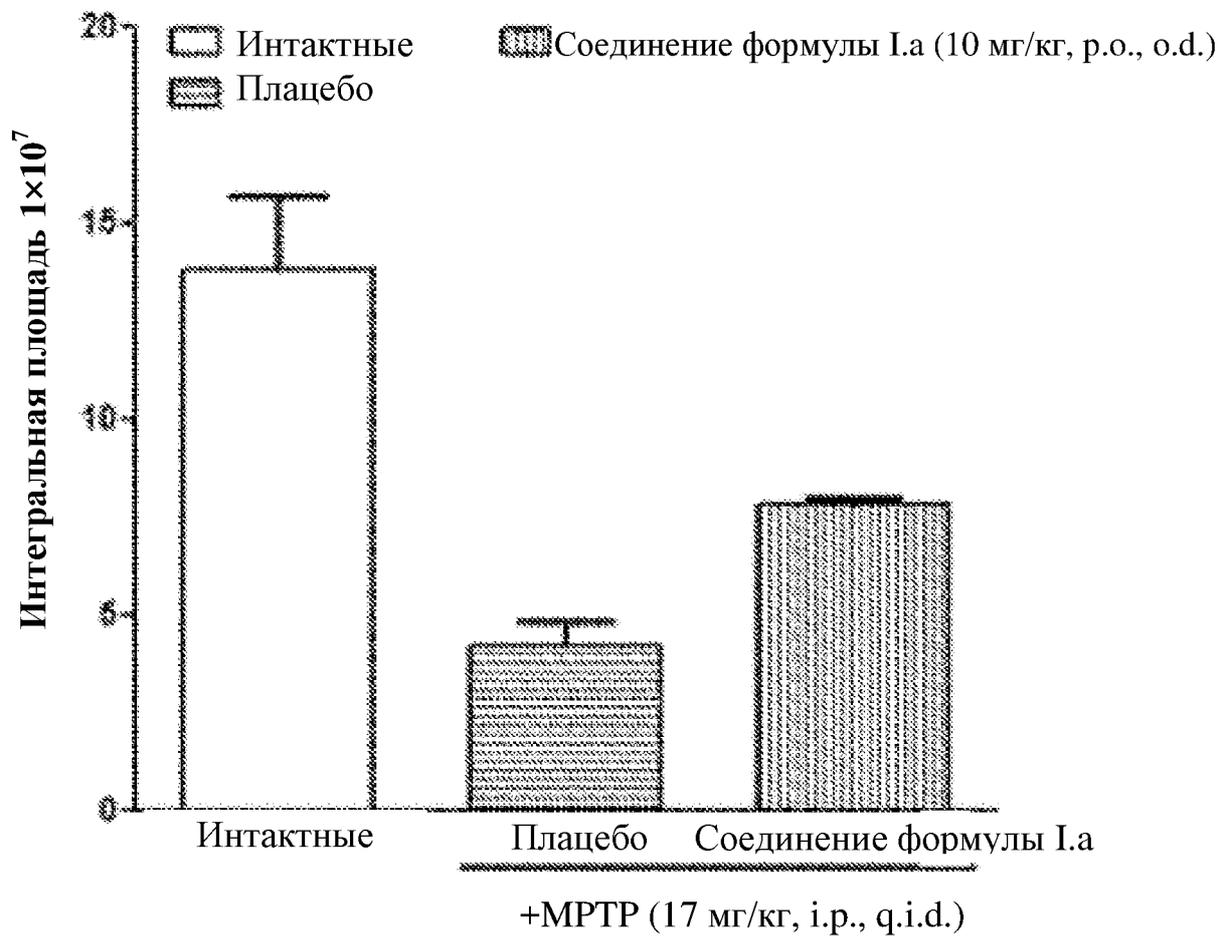
Фиг. 1

Фиг. 2. Процентное значение площади TH-положительных нейронов при введении соединения формулы I.a.



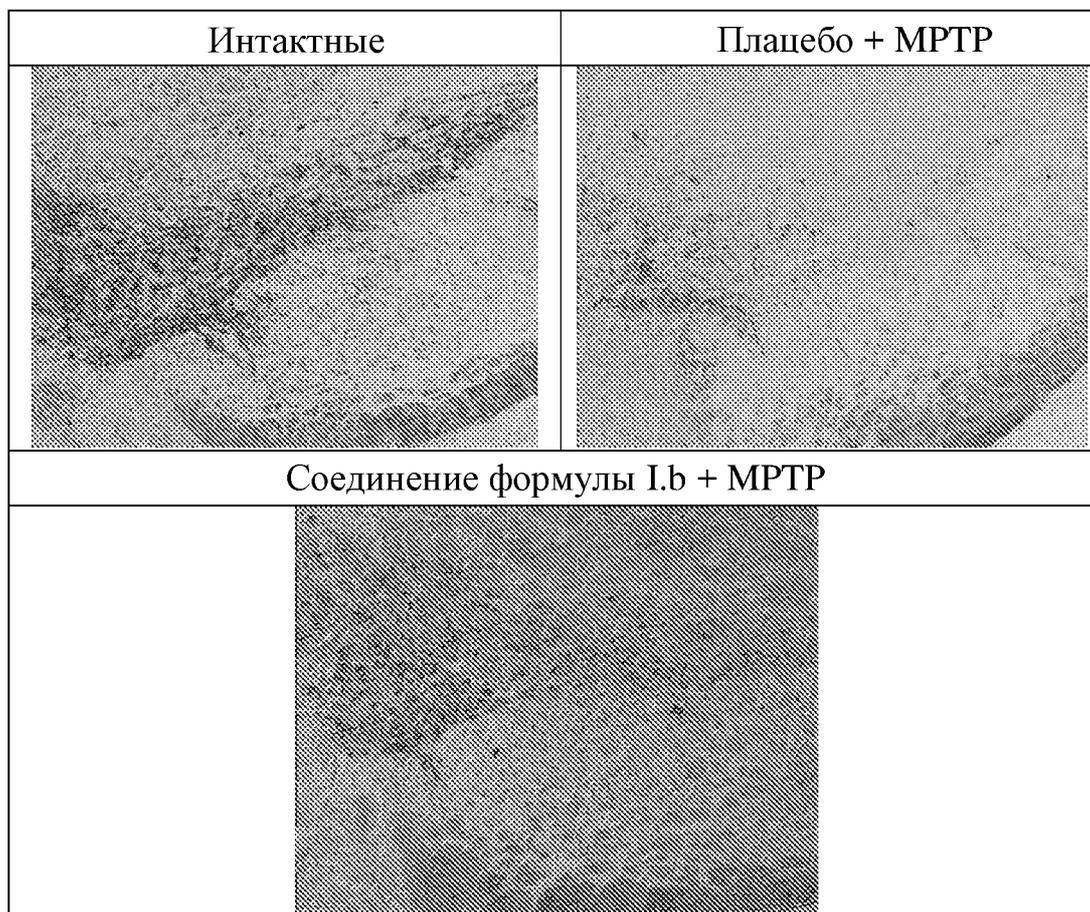
Фиг. 2

Фиг. 3. Интегральная плотность ТН-иммунореактивности при введении соединения формулы I.a и нилотиниба



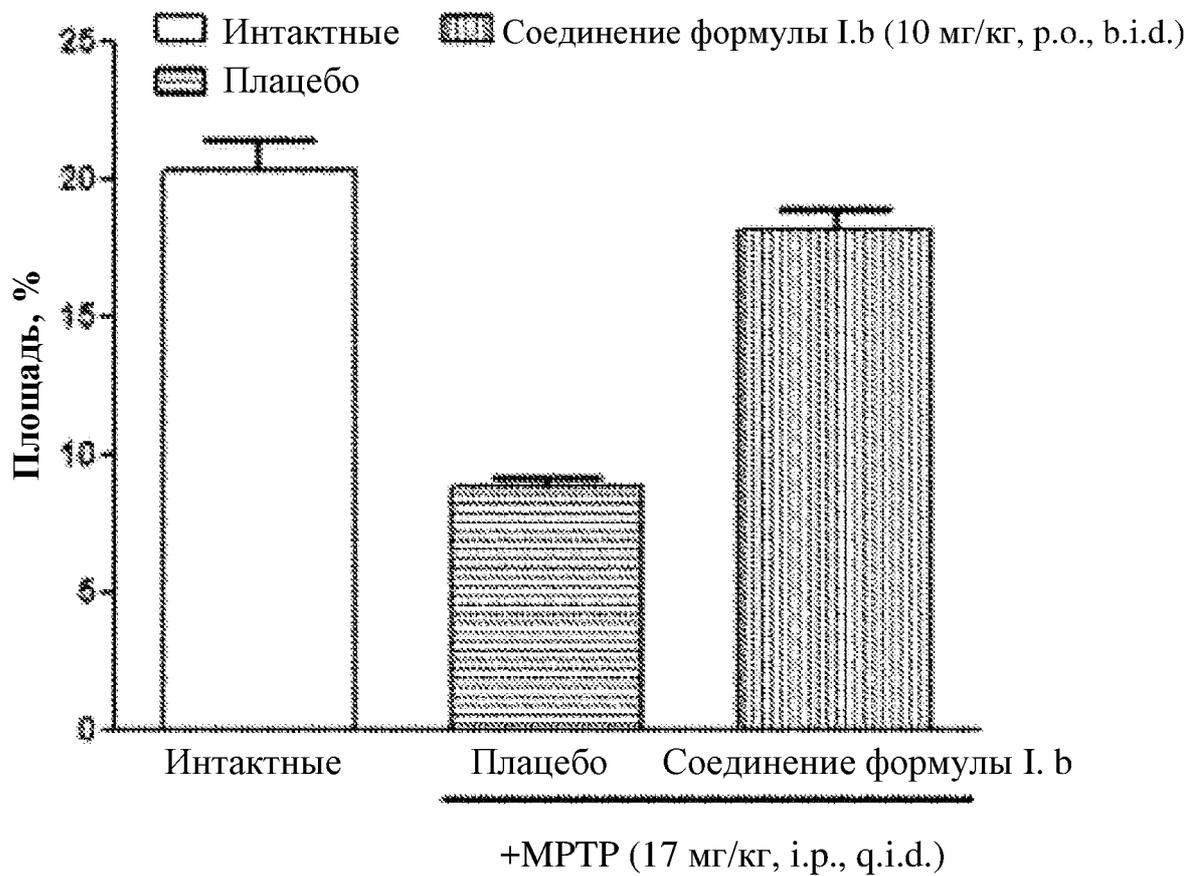
Фиг. 3

Фиг. 4. Микрофотоснимки коронарных срезов, на которых показаны нейроны, положительные по тирозингидроксилазе (ТН)



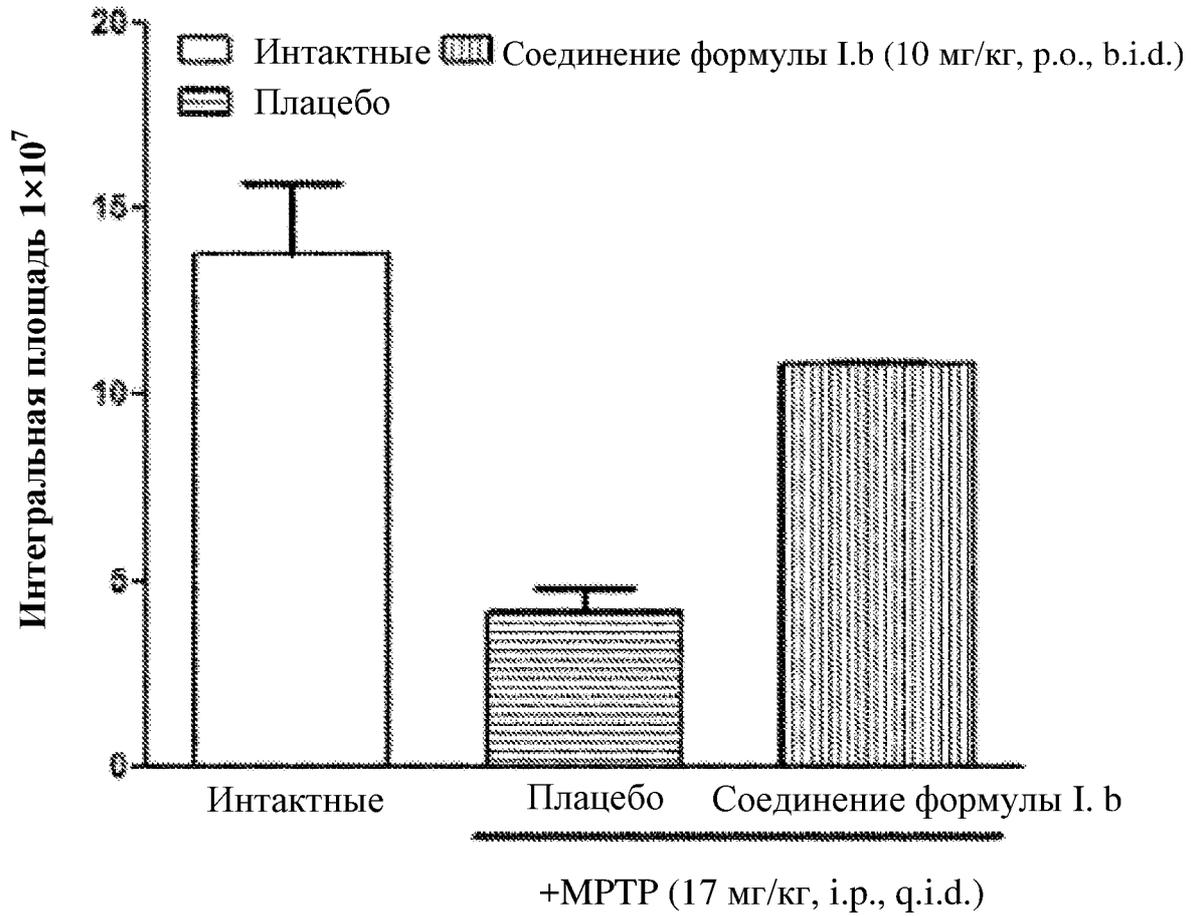
Фиг. 4

Фиг. 5. Процентное значение площади TH-положительных нейронов при введении соединения формулы I.b.



Фиг. 5

Фиг. 6. Интегральная плотность ТН-иммунореактивности при введении соединения формулы I.b и нилотиниба.



Фиг. 6