



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.11

(21) Номер заявки
201892462

(22) Дата подачи заявки
2017.05.03

(51) Int. Cl. **C07D 319/06** (2006.01)
A61K 31/357 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/06 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)

(54) ФЕНОЛЬНОЕ СОЕДИНЕНИЕ И ЕГО КОМБИНАЦИЯ С БЕНЗОДИАЗЕПИНОМ, КОНДЕНСИРОВАННЫМ С 1,4-ДИГИДРОПИРИДИНОМ, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПОРАЖЕНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ И СОСУДИСТОЙ СИСТЕМ

(31) **2016-0059**

(32) **2016.05.04**

(33) **CU**

(43) **2019.07.31**

(86) **PCT/CU2017/050003**

(87) **WO 2017/190714 2017.11.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**УНИВЕРСИДАД ДЕ ЛА
ГАВАНА; СЕНТРО ДЕ
ИНВЕСТИГАЦИОН И ДЕСАРРОЛЬО
ДЕ МЕДИКАМЕНТОС СИДЕМ (CU)**

(72) Изобретатель:
**Очоа Родригуес Эстаел, Вердеция
Рейес Ямила, Нунез Фигуэредо Яниер,
Рамирез Санчез Дженей, Вонг Гуерра
Майлин, Фонзека Фонзека Луис
Артуго, Пардо Андреу Гилберто
Лазаро, Канаан-Хаден Наварро
Клаудиа Аманда, Мондело Родригес
Абель, Барзага Фернандес Педро
Жильберто, Гонзалес Алфонсо Никте,
Делгадо Хернандес Рене, Падрон Якис
Александр Саул (CU)**

(74) Представитель:
Рыбина Н.А., Рыбин В.Н. (RU)

(56) DELPHINE VIVIER ET AL.: "Development of the First Two-Pore Domain Potassium Channel TWIK-Related K + Channel 1-Selective Agonist Possessing in Vivo Antinociceptive Activity", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 60, no. 3, 9 Febrero 2017 (2017-02-09), paginas 1076-1088, XP055394873, ISSN: 0022-2623, DOI:10.1021/acs.jmedchem.6b01285, compuesto 6 en p. 1080 y Tabla 1 en p. 1081
JP-A-2007063444

BUENDIA IZASKUN ET AL.: "Nrf2-ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases", PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, vol. 157, 23 Noviembre 2015 (2015-11-23), paginas 84-104, XP029374572, ISSN: 0163-7258, DOI:10.1016/J.PHARMTHERA.2015.11.003, todo el documento

SANDHU H. S. ET AL.: "Synthesis and biological evaluation of arylidene analogues of Meldrum's acid as a new class of antimalarial and antioxidant agents", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, PERGAMON, GB, vol. 18, no. 15, 1 Agosto 2010 (2010-08-01), paginas 5626-5633, XP027534396, ISSN: 0968-0896 [encontrado en 2010-06-17], citado en la aplicacion, compuesto 9l-9n, Tablas 2-4 y Figura 5

(57) Изобретение относится к химии, фармации и, в частности, к приготовлению лекарственных препаратов из производных фенольных или полифенольных соединений, комбинированных с трициклическими системами соединений класса бензодиазепинов, конденсированных с производными 1,4-дигидропиридинов, воздействующих на центральную нервную и сосудистую системы. Эти фармацевтические композиции демонстрируют ГАМК-эргическое, антиглутаматергическое, модулирующее кальциевые каналы, митопротекторное, антиокислительное, противовоспалительное и антиапоптотическое действие, что можно применять в лечении сердечно-сосудистых, цереброваскулярных, нейродегенеративных, нейропсихиатрических и неврологических заболеваний.

Настоящее изобретение относится к химии, фармации и, в частности, к приготовлению лекарственных препаратов из производных фенольных или полифенольных соединений и из производных фенольных или полифенольных соединений, комбинированных с трициклическими системами соединений класса бензодиазепинов, конденсированных с производными 1,4-дигидропиридинов, воздействующих на центральную нервную и сосудистую системы.

В случае заболеваний многофакторного происхождения, например сердечно-сосудистых, cerebro-васкулярных, нейродегенеративных, нейропсихиатрических и неврологических, для их эффективного лечения недостаточно одного лекарственного средства, поэтому необходимо применять терапию на основе нескольких лекарственных средств. Существует две основные причины отсутствия лекарств для лечения этих заболеваний: 1) лекарства, нацеленные на один патологический механизм, и 2) применение высоких доз, что повышает риск неблагоприятных реакций.

Нейродегенерация является общим признаком многих заболеваний нервной системы и расстройств, таких как деменция, болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Паркинсона (БП). Эти заболевания являются изнурительными и дорогими в лечении, тогда как имеющиеся на сегодня варианты лечения являются неудовлетворительными. Актуальность этой проблемы усугубляется фактом, что распространенность этих возрастных заболеваний быстро растет вследствие происходящих демографических изменений.

Прогрессирующее старение населения сопровождается нежелательными последствиями в виде увеличения количества нейродегенеративных заболеваний и сенильной деменции.

БП представляет собой нейродегенеративное заболевание с симптомами нарушения координации движений: замедленными движениями, оцепенелостью, тремором покоя и изменениями в равновесии. С прогрессированием заболевания у многих пациентов развиваются немоторные симптомы, включая беспокорство, депрессию, констипацию и деменцию.

Эти характеристики объясняются сильным снижением стриарного дофамина и потерей дофаминергических нейронов в компактной части черного вещества (Gauthier, 1982).

Клинические признаки БП появляются после того, как гибель дофаминергических нейронов превышает порог в 70-80%, а потеря стриарных нервных окончаний превышает 50-60% (Agid, 1991).

Исследования механизмов развития БП показали, что потеря дофаминергических нейронов в компактной части черного вещества связана с дефицитом митохондриального комплекса-1 (Jenner 1998).

Хотя существуют лекарства, которые облегчают симптомы болезни Паркинсона, постоянное применение этих лекарств не эффективно в отношении предотвращения прогрессирования БП и было связано с появлением истощающих побочных явлений.

Следовательно, большой интерес представляет разработка вариантов нейропротективной терапии, которые замедляют или даже останавливают дегенеративное прогрессирование.

По оценкам во всем мире живет 46,8 млн людей с деменцией. Согласно оценкам это число будет увеличиваться практически вдвое каждые 20 лет; до 74,7 млн в 2030 г. и 131,5 млн в 2050 г. Деменция также оказывает огромное влияние на экономику. По оценкам на сегодняшний день общие мировые затраты, связанные с деменцией, составляют 818 млрд, а к 2018 г. они достигнут триллиона долларов; при этом она имеет огромное влияние на качество жизни пациентов, а также их семей и специалистов по уходу (Alzheimer's Disease International, World Alzheimer Report 2015. London: Alzheimer's Disease International, 2015).

Из всех этих заболеваний наиболее распространенной является БА, от которой страдает около 35 млн людей, и по оценкам распространенность этого заболевания существенно возрастет в следующие три десятилетия наряду с увеличением среднего возраста населения (Reitz, C. Brayne, C. Mayeux, R. Epidemiology of Alzheimer's disease, Nat. Rev. Neurol., 2011, 7, 137-152) (Reitz, C., Mayeux, R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, Risk factors and biomarkers, Biochem, Pharmacol., 2014, 88, 640-651).

БА представляет собой нейродегенеративное расстройство головного мозга, которое приводит к медленному прогрессированию нарушений функций памяти и когнитивных функций; часто в сопровождении поведенческих изменений, таких как агрессия и депрессия (Querfurth, H.W., LaFerla, F.M. Alzheimer's disease, N. Engl. J. Med., 2010, 362, 329-344). На последней стадии пациент прикован к кровати, страдает недержанием и зависит от ухода и опеки, что является очень затратным для родственников. Смерть наступает в среднем через 9 лет после постановки диагноза (Citron M. (2004), Strategies for disease modification in Alzheimer's disease, Nat Rev Neurosci 5 (9): 677-85). Большое число людей, страдающих от этого заболевания и требующих постоянного ухода и других услуг, будет сильно сказываться на медицинских, монетарных и человеческих ресурсах (Suh YH and Checler F. (2002). Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-15 synuclein: molecular pathogenesis And pharmacological applications in Alzheimer's disease, Pharmacol Rev. 54 (3): 469-525).

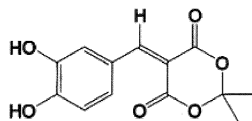
Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-15 synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. Pharmacol Rev. 54 (3): 469-525). Таким образом, это является медицинской проблемой, вызывающей все большее беспокойство.

Ишемия головного мозга является одной из основных причин смерти и первой причиной недееспособности взрослых людей во многих странах (Mukherjee, D., Patil, CG, 2011. Epidemiology and the global burden of stroke, World Neurosurg. 76, S85-S90). На сегодняшний день только активатор тканевого плаз-

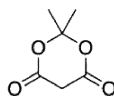
миногена является лекарством, утвержденным для применения в терапии человека во время острой фазы ишемии головного мозга (Howells, DW, Donnan, GA, 2010. Where will the next generation of stroke treatments come from? *PLoS Med.* 7, e1000224). Несмотря на полученные обнадеживающие доклинические результаты, ни один из оцениваемых кандидатных препаратов не продемонстрировал соответствующее клиническое улучшение. Это может быть связано с наличием множества механизмов, вовлеченных в каскад нейронального повреждения после ишемии головного мозга, что контрастирует с более упрощенным представлением предложенных нейропротекторов (Minnerup, J., Schabitz, WR., 2009. Multifunctional actions of approved and Candidate stroke drugs, *Neurotherapeutics* 6, 43-52). Накопленные доклинические сведения показывают, что высокоселективный лиганд для заданной биологической мишени не всегда приводит к получению клинически эффективного лекарства, в частности, при тех патологиях, в которые вовлечено множество факторов, таких как ишемия головного мозга. Следовательно, лекарства, действующие в одном участке ишемического каскада, такие как блокаторы Ca^{2+} , антагонисты глутамата, агонисты ГАМК, антиоксиданты/поглотители свободных радикалов, предшественники фосфолипидов и противовоспалительные агенты, в целом оказались клинически неэффективными (Ginsberg, MD, 2008. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future, *Neuropharmacology* 55, 363-389).

В появляющихся нейропротективных подходах начали учитывать дисфункцию митохондриальной биоэнергетики. Есть данные, которые позволяют предположить, что митохондрии играют ключевую роль в ишемическом нейрональном повреждении путем активации болевых сигналов посредством как структурного, так и функционального повреждения или посредством расширения каскада, который в итоге приводит к гибели клеток (Christophe, M., Nicolas, S., 2006. Mitochondria: a target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia-reperfusion. *Curr. Pharm. Des.* 12, 739-757) (Mazzeo, AT, Beat, A, Singh, A., Bullock, MR, 2009. The role of mitochondrial transition pore and its modulation intraumatic brain injury and delayed neurodegeneration after TBI. *Exp. Neurol.* 218, 363-370) (Perez-Pinzon, MA, Stetler, RA, Fiskum, G., Mitochondrial targets for neuroprotection, *J. Cereb. BloodFlow. Metab.* 32, 1362-1376). Следовательно, существует возрастающий интерес к определению новых классов соединений, которые одновременно действуют на определенные токсические процессы в ишемических нейронах, включая действующие на митохондриальном уровне.

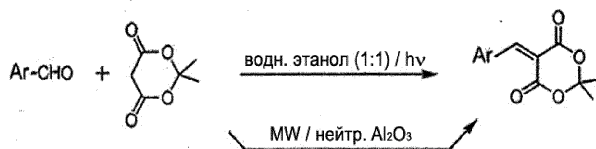
Применение фенольных или полифенольных производных в лечении заболеваний центральной нервной системы было широко описано в литературе, однако их высокая растворимость в воде (обеспечиваемая, главным образом, гидроксильными группами) затрудняет прохождение этих соединений через гематоэнцефалический барьер и попадание в головной мозг. Авторы изобретения получили продукт (5-((3,4-дигидроксифенил)метилен)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-дион) или КМ 34



Кислоту Мельдрума (2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-дион) и ее производные активно использовали в качестве стартовых материалов для синтеза многих гетероциклов, в частности для оценки их потенциальной биологической активности.

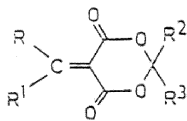


Конденсацию кислоты Мельдрума с ароматическими альдегидами проводили в растворе этанола и воды в присутствии катализатора посредством высокоэффективного фотохимического процесса с окружающей средой (A novel light induced Knoevenagel condensation of Meldrum's acid with aromatic aldehydes in aqueous ethanol. Somnath Ghosh, Jhantu Das, Subhagata Chattopadhyay, *Tetrahedron Letters*, Volume 52, Issue 22, 1 June 2011, Pages 2869-2872).

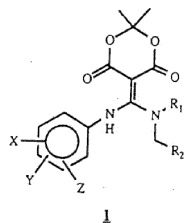


Эти производные демонстрируют противомикробную активность. Другой ряд арилиденовых аналогов кислоты Мельдрума (Sandhu HS and all (2010) Synthesis and biological evaluation of arylidene analogues of Meldrum's acid as a new class of antimalarial and antitoxinant agents *Bioorg Med Chem.* 2010 Aug 1; 18 (15): 5626-33) оценивали *in vitro*, продемонстрировав их противомалерийную и антиокислительную активность, а также ингибирование агрегации тромбоцитов (Abdelaziz El Maatougui, Jhonny Azuaje, Alberto Coelho, Ernesto Cano, Matilde Yanez, Carmen Lopez, Vicente Yaziji, Carlos Carbajales and Eddy Sotelo (4)) *Discovery and Preliminary SAR of 5-Arylidene-2,2-Dimethyl-1,3-Dioxane-4,6-Diones as Platelet Aggregation Inhibitors*, Pages 551-554 (4)).

Несколько патентов защищают права на этот тип соединений, а также их применение с терапевтическими свойствами. В патенте ES 2074770 показаны процедуры приготовления производных 1,3-диоксан-4,6-диона.

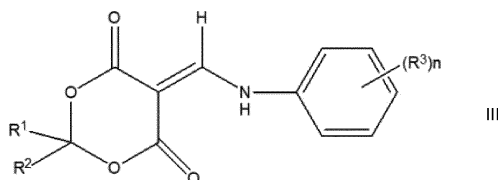


Коингибиторы ацил-CoA:холестеринацилтрансферазы на основе N,N',N'-тризамещенного 5-бис-аминометил-1,3-диоксан-4,6-диона также описаны в патенте ES 2077985 формулой

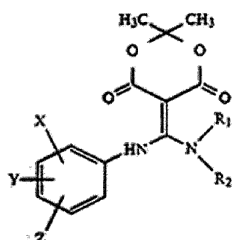


Это изобретение относится к химическим соединениям, которые демонстрируют ингибиторный эффект в отношении коэнзима А: холестеринацилтрансферазы (ACAT). Соединения этого типа помогают снизить всасывание холестерина и, следовательно, оказывают эффект на атеросклероз.

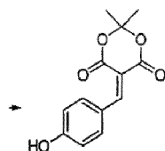
В JPN 11180975 описано соединение формулы III, 2,2-диметил-5-(4-метоксикарбонилметилоксифениламинометил)-1,3-диоксан-4,6-дион; которое обладает превосходной способностью поглощать ультрафиолет, благоприятным влиянием на растрескивание кожи и низкой способностью к абсорбции через кожу.



Патент США 5217174 защищает права на 5-((3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифениламино)-(метилпиридин-4-иламино)метил)-2,2-диметил-[3]диоксан-4,6-дион.



В WO 200586661 защищены права на соединение, фармацевтическую композицию и способ применения для лечения метаболических расстройств. В этом случае предложено получить продукт, который демонстрирует значительную активность, для лечения диабета типа II, в процессе чего получают промежуточное соединение с общей формулой:



В литературе представлен патент, который относится к трициклическим системам типа бензодиазепинов, конденсированным с производными 1,4-дигидропиридина, которые воздействуют на центральную и сосудистую нервную систему (CU 2009/000172), но это изобретение не включает комбинацию таких трициклических производных с фенольными или полифенольными производными, в которых были бы скомбинированы ГАМК-эргическое, антиглутаматергическое, модулирующее кальциевые каналы, митопротекторное, антиокислительное (поглощение свободных радикалов и хелатирование железа), противовоспалительное и антиапоптотическое действия; которые бы лежали в основе их применения в лечении сердечно-сосудистых, цереброваскулярных, нейродегенеративных, нейропсихиатрических и неврологических заболеваний, а также применения меньших доз и, следовательно, появления меньшего количества побочных явлений.

В качестве дополнительного аспекта настоящего изобретения фенольное соединение КМ34 в свободной форме или в форме солей, гидратов, кристаллических форм, метаболитов, пролекарств, а также

его комбинация с трициклическими соединениями типа бензодиазепинов, конденсированными с 1,4-дигидропиридином, JM-20, может действовать в качестве активного(ых) ингредиента(ов) разных составов.

Активный(ые) ингредиент(ы) можно вводить в смеси с по меньшей мере одним нетоксичным химически инертным адьювантом, разбавителем и/или носителем, которые далее по тексту называются вспомогательными веществами, включенными в предложенные фармацевтические композиции.

Фармацевтические композиции, предусматривающие любую жидкую композицию, твердую или полутвердую, можно вводить пероральным, буккофарингеальным, подязычным, парентеральным, например внутримышечным, внутривенным, интрадермальным или подкожным, местным, трансдермальным, трахеальным, бронхиальным, назальным, ингаляционным, ректальным или другими путями введения.

Описанные фармацевтические композиции будут содержать подходящие вспомогательные вещества для каждого состава. Составы готовят традиционным образом, способами, известными в существующем уровне техники. Вспомогательные вещества подбирают в соответствии с выбранной фармацевтической формой в соответствии с путем введения.

Активный(ые) ингредиент(ы) для введения людям может(гут) находиться в фармацевтически приемлемых дозированных формах, включая, но не ограничиваясь этим, такие формы выпуска: таблетки (включая подязычные, содержащие покрытие и разжевываемые таблетки), твердые и мягкие капсулы (включая микрокапсулы, наночастицы и пеллеты), растворы (пероральные капли, сиропы), парентеральные растворы, трансдермальные пластыри, имплантаты и другие системы замедленного действия, мази (кремы и гели), назальный спрей, мукоадгезивные средства, суппозитории, суспензии, восстанавливаемые или добавляемые к еде порошки, среди прочих дозированных форм, входящих в это изобретение.

Применяя технологические процессы, известные в существующем уровне техники, активный(ые) ингредиент(ы) можно готовить в виде дозированных форм, подходящих для введения, путем смешивания их со вспомогательными веществами, такими как жидкие, твердые или полутвердые вспомогательные вещества, органические и неорганические соединения, природного или синтетического происхождения. Они включают твердые наполнители, разбавители, связующие вещества, растворители, эмульсификаторы, лубриканты, разрыхлители, глиттеры, красители, пигменты, полимеры, подсластители, пластификаторы, усилители всасывания, усилители проницаемости, поверхностно-активные вещества, вспомогательные поверхностно-активные вещества, специальные масла и/или буферные системы, которые обеспечивают физическую, химическую и/или биологическую стабильность активных соединений или их физиологически приемлемых солей.

Некоторые вспомогательные вещества, используемые при приготовлении дозированных форм, содержащих активное(ые) вещество(а), отличное(ые) от других используемых вспомогательных веществ, представляют собой крахмалы, лактозу, целлюлозу и ее производные, сахарозу, сорбит, маннит и другие сахара, тальк, диоксид титана, поливинилпирролидон, повидоны, желатин, лактопротеины, цитраты, тарtrato, альгинаты, декстран, этилцеллюлозу, циклодекстрины, силиконовые эластомеры, полисорбаты, амилпектин, парабыны, животные и растительные масла, пропиленгликоль, стерильную воду, одно- или многоатомные спирты, такие как глицерин, стеарат магния, стеарат кальция, стеарилфумарат натрия, лаурилсульфат натрия, глицерин и воски на основе полиэтиленгликоля, среди прочего.

Твердые пероральные дозированные формы, такие как таблетки, микрогранулы, наночастицы, пеллеты, восстанавливаемые порошки или капсулы, содержащие активный(ые) ингредиент(ы) в соответствии с настоящим изобретением, могут характеризоваться немедленным высвобождением или регулируемым высвобождением.

Выбранная фармацевтическая форма в соответствии с настоящим изобретением представлена таблетками, содержащими активный(ые) фармацевтический(ие) ингредиент(ы), при этом смесь готовят с микрокристаллической целлюлозой, кукурузным крахмалом, кросповидоном, раствором поливинилпирролидона и натрием для образования гранулята, для завершения процесса его высушивают в псевдооживленном слое и смешивают со стеаратом магния и тальком, после этого делают таблетки, используя для их производства систему роторных прессов, и наконец таблетки покрывают суспензией гидроксипропилметилцеллюлозы, полиэтиленгликоля 4000, диоксида титана и красителя.

Покрытие таблеток обеспечивает эстетичность конечной формы и позволяет избежать неприятного вкуса, что достигается с помощью маскирующего вкус агента, такого как сополимер метакриловой кислоты, этилцеллюлоза, метилгидроксипропилцеллюлоза или другие полимеры. Таблетки можно получать как вышеописанным способом влажной грануляции, так и способом прямого прессования, используя вспомогательные вещества для этапов прямого прессования и уменьшения размеров на этапе таблетирования, при условии работы с низкими дозами.

Таблетки могут характеризоваться регулируемым высвобождением и могут содержать активный(ые) ингредиент(ы) в микрогранулах, наночастицах или матричных системах с применением таких вспомогательных веществ, как полиэтиленоксид, гидроксипропилметилцеллюлоза 2910, стеарат магния, хлорид натрия, оксид железа красный, ацетат целлюлозы, полиэтиленгликоль 3350 и опадрай.

Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением могут содержать фарма-

цветически приемлемые, проницаемые, биоразлагаемые и нерастворимые в воде полимеры для контроля профиля высвобождения, посредством чего можно получать дозированные формы с регулируемым (немедленным, замедленным или контролируемым) высвобождением. Эти полимеры можно использовать в покрытии таблеток, микрогранул, капсул, в приготовлении наночастиц, в качестве регулирующих высвобождение матриц в пеллетах, таблетках, гранулах или в смеси с другими вспомогательными веществами, включенными в любую другую дозированную форму, упоминаемую в настоящем изобретении.

В случае перорального введения другие подходящие фармацевтические композиции представлены твердыми капсулами, мягкими капсулами и фармацевтическими порошками, при этом физиологически приемлемый(ые) активный(ые) ингредиент(ы) можно дозировать в форме твердых желатиновых или целлюлозных капсул, например, содержащих смесь активного фармацевтического ингредиента со вспомогательными веществами, обычно используемыми в твердых формах и описанными для таблеток, при этом указанную смесь можно получать методом сухой, влажной грануляции, экструзии, пеллетизации, микроинкапсулирования или дозирования микропланшетов. При дозировании в мягких желатиновых капсулах применяют традиционные способы приготовления, и они могут включать смешивание активного(ых) ингредиент(ов) с растительными маслами, жирами или другими аналогичными базовыми растворами, подходящими для приготовления состава.

В случае фармацевтических порошков их можно готовить, просто смешивая физиологически приемлемый(ые) активный(ые) ингредиент(ы) с наполнителями, суспендирующими агентами, подсластителями, вкусоароматическими добавками и консервантами. Однако при приготовлении порошков согласно настоящему изобретению применяли метод распылительной сушки с температурой на входе 100-150°C и температурой на выходе 50-90°C, используя вспомогательные вещества, такие как декстран, полиэтиленгликоль 4000 и лаурилсульфат натрия, среди прочих, для улучшения растворимости активного фармацевтического ингредиента в зависимости от надлежащего введения в организм в растворах или путем добавления в пищу в виде жидкостей.

В случае ректального введения физиологически приемлемый(ые) активный(ые) ингредиент(ы) можно дозировать в форме суппозитория, пен или ректального раствора в микроспринцовках, которые могут содержать смесь активных соединений с твердой нейтральной жирной основой (Витепсол 45) или другой основой. Также можно использовать аналогичный носитель, подходящий для приготовления состава, например, сорбитанмоноолеат, полисорбат 20, эмульсифицирующий воск, безводный коллоидный диоксид кремния, фосфаты натрия, макрогол 300, глицерин, воду, пропан, изобутан и н-бутан.

В случае перорального введения жидкости физиологически приемлемый(ые) активный(ые) ингредиент(ы) можно готовить в виде сиропов, эликсиров, концентрированных капель или суспензий, содержащих фармацевтически приемлемый носитель в виде смеси этанола, воды, глицерина, пропиленгликоля и/или полиэтиленгликоля, среди прочего, карбоксиметилцеллюлозу или другие загустители, они могут содержать красители, вкусоароматические добавки, подсластители (сахарозу, аспартам, цикламат, стевию), консерванты (парабены, бензоаты). Эти жидкие дозированные формы можно готовить путем восстановления порошкообразных фармацевтических композиций подходящим растворителем перед применением.

В случае парентерального введения физиологически приемлемый(ые) активный(ые) ингредиент(ы) можно готовить в виде инъекционных растворов. Такие растворы могут содержать стабилизирующие ингредиенты, консерванты и/или буферные ингредиенты. В настоящем изобретении активный фармацевтический ингредиент находится в растворе 96% этанола, бензилового спирта, пропиленгликоля, бензойной кислоты, бензоата натрия, гидроксида натрия, воды для инъекций, других вспомогательных веществ, таких как полиэтиленгликоль 400, цитрат натрия и лимонная кислота.

Растворы для парентерального введения, содержащие физиологически приемлемый(ые) активный(ые) ингредиент(ы), также можно готовить путем восстановления перед применением сухой (лиофилизированной) фармацевтической композиции подходящим растворителем, содержащим вспомогательные вещества, такие как маннит, полисорбат 80, хлорид натрия, среди прочих.

В случае подкожного введения физиологически приемлемый(ые) активный(ые) ингредиент(ы) можно дозировать в форме имплантатов, используя эластомерные вспомогательные материалы из силикона и безводного коллоидного кремния, хотя для приготовления пеллет можно использовать другие полимеры, применяемые в фармацевтике.

В случае трансдермального введения физиологически приемлемый(ые) активный(ые) ингредиент(ы) можно готовить в виде пластырей, в случае чего активный фармацевтический ингредиент содержится в носителе, состоящем из раствора акрилового сополимера, этанола, легкого вазелинового масла, изопропилпальмитата, полиэтилентерефталата, этиленвинилацетата и силиконового слоя с внутренней стороны пленки, с которой происходит высвобождение (с номинальной скоростью высвобождения 15 мг/сутки с поверхности площадью 12,75 см²).

Примеры

Пример 1. Синтез 5-(3,4-дигидроксibenзилиден)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-диона.

Эквиволярные количества 3,4-дигидроксibenзальдегида и кислоты Мельдрума смешивают в баллоне, оснащенном магнитной мешалкой, используя деионизированную воду в качестве растворителя в пропорции 1-2 л на моль реагентов. Реакционную смесь перемешивают в течение приблизительно 3-5 ч. Через указанное время получают желтый осадок, который собирают посредством вакуумной фильтрации, промывают водой от трех до пяти раз и помещают в осушитель. Реакцию отслеживают с помощью тонкослойной хроматографии (на силикагеле), используя н-гексан-этилацетат (1:1) в качестве подвижной фазы.

Время реакции (3-5 ч); выход > 75%.

Температура плавления: 154-157°C (нескорректированная).

Приготовление разных составов (из производных фенольных или полифенольных соединений и из производных фенольных или полифенольных соединений, комбинированных с трициклическими подобными бензодиазепинам системами, конденсированными с производными 1,4-дигидропиридинон) для биологической оценки.

Пример 2. Приготовление суспензионного порошкообразного состава, содержащего КМЗ4 в качестве активного фармацевтического ингредиента.

Каждая чайная ложка (5 мл) порошка КМЗ4 для суспензии содержит:

КОМПОНЕНТ	КОЛИЧЕСТВО	ФУНКЦИЯ
КМ 34	40,00 мг	Активный ингредиент
Поливинилпирролидон (коллидон К-30)	50,00 мг	Суспендирующий агент
Кросповидон (коллидон CL-M)	133,33 мг	Суспендирующий агент
Тяжелый оксид магния	210,00 мг	Агент, маскирующий вкус и запах
Сахарин натрия	16,66 мг	Подсластитель
Порошкообразный мятный ароматизатор	13,33 мг	Вкусоароматический агент
Порошкообразный клубничный ароматизатор	20,00 мг	Вкусоароматический агент
Сахароза	1183,34 мг	Наполнитель

Краткое описание технологического процесса

Сахарин натрия и сахарозу размалывают на высокоскоростной мельнице и просеивают через сито с меш # 20 активный ингредиент, порошок со вкусом мяты и тяжелый оксид магния, а через сито с меш # 60 - порошок со вкусом клубники.

Взвешивают количества исходных материалов в соответствии с описанной рецептурой.

Смешивают в течение 10 мин на миксере Vanguard V-5.

Собирают смешанный продукт в контейнеры с двойным нейлоновым мешком.

Переносят продукт в смеситель и расфасовывают по 5 г продукта по 60 мл бутылочкам из темного стекла.

Пример 3. Приготовление таблетированного состава, содержащего КМЗ4 в качестве активного фармацевтического ингредиента.

Каждая 120,00 мг таблетка содержит:

Компонент	Количество	Функция
КМ 34	40,00 мг	Активный ингредиент
Кукурузный крахмал	23,00 мг	Разрыхлитель
Поливинилпирролидон К-25	4,00 мг	Связующее вещество
Моногидрат лактозы	50,50 мг	Наполнитель
Стеарат магния	1,50 мг	Лубрикант
Коллоидный диоксид кремния	1,00 мг	Лубрикант
Этанол, класс С*	12,00 мкл	Растворитель
Деионизированная вода*	12,00 мкл	Растворитель

*Испаряются во время процесса сушки.

Краткое описание технологического процесса

1) Просеивают активный ингредиент, крахмал и лактозу через сито с меш 20.

2) Взвешивают все компоненты состава в соответствии с количествами, указанными в формуле.

3) Для приготовления связующего раствора выливают смесь воды и этилового спирта класса С в емкость с паровой рубашкой, добавляют поливинилпирролидон и перемешивают до полного растворения.

4) Наполняют миксер активным ингредиентом, крахмалом и лактозой (компоненты дисперсной фазы). Смешивают в течение 15 мин.

5) Медленно добавляют связующий раствор, используя перистальтический насос, обеспечивают необходимую степень смачивания, используя воду и этиловый спирт класса С (1:1) в случае необходимости. Гранулируют на мельнице на низкой скорости.

6) Сушат гранулят в псевдоожиженном слое. Через 10 мин отбирают репрезентативный образец гранулята, дегранулируют и проверяют в отношении остаточной влажности; значение указанной влажности должно составлять 0,8-1,2%.

7) Смешивают сухие гранулы с лубрикантами в течение 10 мин.

8) Прессуют на высокоскоростной роторной установке, используя плоские, обеспечивающие скошенные кромки и желобки пресс-формы $\frac{1}{4}$ " ($\frac{1}{4}$ PBR), корректируя штамповочный пресс так, чтобы получать таблетки со следующими параметрами:

Масса: 120,0 мг $\pm$ 10%

Высота: 2,6 $\pm$ 0,10 мм

Твердость: 4,0 $\pm$ 1 кгс

Истираемость: менее 1%

Пример 4. Приготовление состава в инъекционной форме, содержащего КМ34 в качестве активного фармацевтического ингредиента.

Каждая ампула КМ34 (2 мл) содержит:

Компонент	Каждый мл содержит	Количество на единицу дозы	Функция
КМ 34	5,0 мг	10,0 мг	Активный ингредиент
Кремофор ELP	527,0 мг	1054,0 мг	Кoadъювант
Хлористоводородная кислота, 1 Н, c.s.p	-	-	Раствор для доведения pH
Дегидратированный спирт, c.s.	1,0 мл	2,0 мл	Растворитель
*Азот, cs	-	-	

1) Проверяют, чтобы реактор был полностью сухим после стерилизации, в ином случае его промывают дегидратированным спиртом.

2) Готовят 1 Н раствор хлористоводородной кислоты для доведения pH.

3) Добавляют в реактор порцию кремофора ELP и дегидратированного спирта. Смешивают при 420 об/мин.

4) Взвешивают активный ингредиент и добавляют порции дегидратированного спирта в содержащий его химический стакан, распределяют с помощью стеклянной мешалки и добавляют в реактор, повторяют эту операцию, пока не будет исчерпан весь активный ингредиент и не закончится дегидратированный спирт.

5) В реакторе перемешивание продолжают в течение 60 мин при 420 об/мин, пока не произойдет полное растворение активного ингредиента.

6) Добавляют остаток кремофора ELP путем извлечения остатка с помощью дегидратированного спирта, встряхивают в течение 10 мин при 420 об/мин.

7) Определяют pH раствора и доводят 1 Н раствором хлористоводородной кислоты до значения 5,0-6,0.

8) Дополняют объем раствора, добавляя дегидратированный спирт. Перемешивают в течение 5 мин при 420 об/мин.

9) Отбирают 10 мл раствора и отправляют в лабораторию для контроля процесса (титрование и pH).

10) Проверяют правильность сборки систем наполнения и азотирования.

11) Проводят проверку целостности фильтра Sartobran P MidiCaps, пористость (0,45 + 0,2 мкм) дегидратированным спиртом.

12) После завершения контроля процесса повышают давление в реакторе, используя азот (0,7-1,0 бар), чтобы раствор проходил через патронный фильтр Sartobran P с пористостью 0,45 мкм + 0,2 мкм. Ампулы наполняют и запечатывают, отмеряя по 2,2 мл раствора.

Пример 5. Приготовление таблетированного состава, содержащего комбинацию КМ34 и JM 20 в качестве активного фармацевтического ингредиента.

Каждая 120,00 мг таблетка содержит:

Компонент	Количество	Функция
КМ 34	20,00 мг	Активный ингредиент
JM 20	20,00 мг	Активный ингредиент
Кукурузный крахмал	23,00 мг	Разрыхлитель
Поливинилпирролидон К-25	4,00 мг	Связующее вещество
Моногидрат лактозы	50,50 мг	Наполнитель
Стеарат магния	1,50 мг	Лубрикант
Коллоидный диоксид кремния	1,00 мг	Лубрикант
Этанол, класс С*	12,00 мкл	Растворитель
Деионизированная вода*	12,00 мкл	Растворитель

*Испаряются во время процесса сушки.

Краткое описание технологического процесса

- 1) Просеивают активные ингредиенты, крахмал и лактозу через сито с меш 20.
- 2) Взвешивают все компоненты состава в соответствии с количествами, указанными в формуле.
- 3) Для приготовления связующего раствора выливают смесь воды и этилового спирта класса С в емкость с паровой рубашкой, добавляют поливинилпирролидон и перемешивают до полного растворения.
- 4) Наполняют миксер активным ингредиентом, крахмалом и лактозой (компоненты дисперсной фазы). Смешивают в течение 15 мин.
- 5) Медленно добавляют связующий раствор, используя перистальтический насос, обеспечивают необходимую степень смачивания, используя воду и этиловый спирт класса С (1:1) в случае необходимости. Гранулируют на мельнице на низкой скорости.
- 6) Сушат гранулят в псевдоожиженном слое. Через 10 мин отбирают репрезентативный образец гранулята, дегранулируют и проверяют в отношении остаточной влажности; значение указанной влажности должно составлять 0,8-1,2%.
- 7) Смешивают сухие гранулы с лубрикантами в течение 10 мин.
- 8) Прессуют на высокоскоростной роторной установке, используя плоские, обеспечивающие скошенные кромки и прорезы пресс-формы %" (1/4 PBR), корректируя штампочный пресс так, чтобы получать таблетки со следующими параметрами:

Масса: 120,0 мг $\pm$ 10%

Высота: 2,6 $\pm$ 0,10 мм

Твердость: 4,0 $\pm$ 1 кгс

Истираемость: менее 1%

Пример 6. Приготовление состава в форме пероральных капель, содержащего комбинацию КМ34 и JM 20 в качестве активного фармацевтического ингредиента.

Каждый мл (20 капель) содержит:

Компонент	Количество	Функция
КМ 34	20,0 мг	Активный ингредиент
JM20	20,0 мг	Активный ингредиент
Пропиленгликоль	300,0 мг	Раствор коагюлянта
Коллидон 25	160,0 мг	Вязкий агент
Сахарин натрия	12,5 мг	Подсластитель
Красный пунцовый	0,05 мг	Краситель
Лимонная кислота	5,535 мг	Стабилизатор pH
Дигидрат цитрата натрия	20,0 мг	Стабилизатор pH
Этиловый спирт	100,0 мг	Раствор коагюлянта
Метилпарабен	1,8 мг	Антимикробный консервант
Пропилпарабен	0,2 мг	Антимикробный консервант
Жидкий клубничный ароматизатор (растворимый)	20,0 мг	Вкусоароматический агент
Очищенная вода, q.s.	1,0 мл	Базовый раствор

Краткое описание технологического процесса

- 1) Измеряют pH и проводимость очищенной воды во время производства продукта.
- 2) В реактор заливают пропиленгликоль.
- 3) В подходящем вспомогательном сосуде из нержавеющей стали растворяют сахарин натрия в очищенной воде.
- 4) Включают коллидон 25, постепенно впрыскивая, и перемешивают в течение времени, составляющего не менее 30 мин, до получения полной дисперсии.
- 5) Перемешивают и нагревают препарат, поддерживая температуру 40-50°C, в течение 30 мин.
- 6) В полученный на предыдущем этапе продукт включают активные ингредиенты небольшими порциями, продолжая постоянно перемешивать течение 30 мин.
- 7) Прекращают нагрев и ждут, пока препарат не остынет до комнатной температуры, 30 $\pm$ 2°C.
- 8) Растворяют метилпарабен и пропилпарабен в этиловом спирте класса "С" в подходящем вспомогательном сосуде из стекла или нержавеющей стали, постоянно перемешивая до полного растворения.
- 9) В полученный на предыдущем этапе продукт добавляют растворимую жидкость с вкусом клубники и перемешивают до полной гомогенности.
- 10) Полученный на предыдущем этапе продукт медленно вливают в емкость реактора с сильным и постоянным перемешиванием.
- 11) В контейнере из стекла или нержавеющей стали подходящей емкости растворяют лимонную кислоту и дигидрат цитрата натрия в очищенной воде, перемешивают после каждого добавления до полного растворения.
- 12) Полученный на предыдущем этапе продукт медленно вливают в емкость реактора с сильным и

постоянным перемешиванием.

13) В сосуде из стекла или нержавеющей стали подходящей емкости растворяют красный пунцовый в очищенной воде, перемешивая до полного растворения, и включают в препарат.

14) Доводят до predetermined объема очищенной водой. Встряхивают до однородности.

15) Проверяют, чтобы pH поддерживался в диапазоне 4,0-6,0.

16) Проводят финальную фильтрацию, проверяют органолептические характеристики.

17) Фасуют конечный препарат по 15 мл флаконам из темного стекла с $15,0 \pm 1,0$ мл раствора, тщательно запечатывают, используя крышки для предотвращения протекания для маслянистых продуктов.

Пример 7. Приготовление состава в инъекционной форме, содержащего комбинацию КМ34 и JM 20 в качестве активного фармацевтического ингредиента.

Каждая ампула (2 мл) содержит:

Компонент	Каждый мл содержит	Количество на единицу дозы	Функция
КМ 34	2,5 мг	5,0 мг	Активный ингредиент
JM 20	2,5 мг	5,0 мг	Активный ингредиент
Кремофор ELP	527,0 мг	1054,0 мг	Коадьювант
Хлористоводородная кислота, 1 Н, q.s.	-	-	Раствор для доведения pH
Дегидратированный спирт, q.s.	1,0 мл	2,0 мл	Растворитель
Азот, q.s.	-	-	

1) Проверяют, чтобы реактор был полностью сухим после стерилизации, в ином случае его промывают дегидратированным спиртом.

2) Готовят 1 Н раствор хлористоводородной кислоты для доведения pH.

3) Добавляют в реактор порцию кремофора ELP и дегидратированного спирта. Смешивают при 420 об/мин.

4) Взвешивают активные ингредиенты и добавляют порции дегидратированного спирта в содержащий его химический стакан, распределяют с помощью стеклянной мешалки и добавляют в реактор, повторяют эту операцию, пока не будут исчерпаны все активные ингредиенты и не закончится весь дегидратированный спирт.

5) В реакторе перемешивание продолжают в течение 60 мин при 420 об/мин, пока не произойдет полное растворение активных ингредиентов.

6) Добавляют остаток кремофора ELP путем извлечения остатка с помощью дегидратированного спирта, встряхивают в течение 10 мин при 420 об/мин.

7) Определяют pH раствора и доводят 1 Н раствором хлористоводородной кислоты до значения 5,0-6,0.

8) Дополняют объем раствора, добавляя дегидратированный спирт. Перемешивают в течение 5 мин при 420 об/мин.

9) Отбирают 10 мл раствора и отправляют в лабораторию для контроля процесса (титрование и pH).

10) Проверяют правильность сборки систем наполнения и азотирования.

11) Проводят проверку целостности фильтра Sartobran P MidiCaps, пористость (0,45 + 0,2 мкм), дегидратированным спиртом.

12) После завершения контроля процесса повышают давление в реакторе, используя азот (0,7-1,0 бар), чтобы раствор проходил через патронный фильтр Sartobran P с пористостью 0,45 мкм + 0,2 мкм. Ампулы наполняют и запечатывают, отмеряя по 2,2 мл раствора.

Исследования реализации биологической активности

Пример 8. Антиокислительная активность КМ-34.

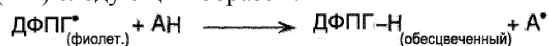
Способность КМ-34 снижать количество радикаловДФПГ

Одним из наиболее часто используемых способов для оценки антиокислительной активности является оценка способности разных соединений снижать количество радикаловДФПГ, что можно определить спектрофотометрически (Brand-Williams et al., 1995). ДФПГ представляет собой стабильный свободный радикал, образующийся вследствие делокализации e^- по всей молекуле, демонстрирующей, что молекулы не димеризуются. Электронная делокализация является причиной интенсивной фиолетовой окраски радикальной формы ДФПГ, когда его готовят в растворе этанола (Molyneux et al., 2004).

Результаты действия КМ-34 (5-400 мкМ) на радикалыДФПГ приведены на фиг. 1. Аналогично, можно наблюдать, что % снижения количества радикалов прямо пропорционален повышению концентрации КМ; при концентрациях выше 5 мкМ и через 30 мин реакции наблюдался значительный % ($p < 0,05$) ингибирования радикаловДФПГ по сравнению с базовым раствором. При концентрациях выше 50 мкМ КМ-34 достигал максимального ответа. Значение IC_{50} , полученное для КМ, было приблизительно в 2,4 раза ниже, чем полученное для аскорбиновой кислоты (АК), используемой в качестве эталонного соединения.

Учитывая его ароматическую природу, это дигидроксизамещенное соединение демонстрирует по-

ведение превосходного донора электронов (Vermerris and Nicholson, 2006) посредством электронного сопряжения (Merchán et al., 1981). Более низкое значение IC_{50} для КМ-34 (16,26 мкМ), чем для АК (38,70 мкМ), демонстрирует сильную антиокислительную эффективность этой молекулы. Тот факт, что наличие фенольных групп обеспечивает антиокислительные свойства (Fraga, 2007), позволяет представить действие этого полифенола (АН) следующим образом:



Стабильность радикала, образуемого вследствие действия КМ, является важным условием для антиокислительной активности. Отрицательный заряд делокализован в ароматической системе, что приводит к заметной ионной стабильности (Merchán et al., 1981).

Активность захвата радикалов $O_2^{\bullet-}$ КМ-34 в исследовании с пирогаллолом

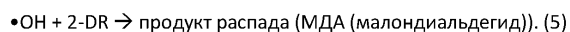
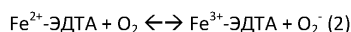
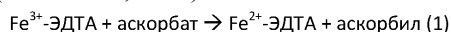
Неферментативную систему, генерирующую эти радикалы, использовали для оценки $O_2^{\bullet-}$ -изолирующей активности КМ-34, который катализирует самоокисление пирогаллола с образованием окрашенного соединения, которое поглощает на 420 нм (Marklund, 1985). Как показано на фиг. 2, концентрации КМ-34 более 5 мкМ значительно ингибировали ($p < 0,05$) образование окисленной формы пирогаллола по сравнению с базовым раствором, при этом значение IC_{50} составляло 11,04 мкМ. Начиная с 50 мкМ окисление пирогаллола ингибировалось полностью.

Результаты этого исследования подтверждают тот факт, что КМ-34 является эффективным поглотителем свободных радикалов $O_2^{\bullet-}$, ответственных за стимуляцию реакций, которые ускоряют образование окисленной формы пирогаллола. В физиологических условиях повышенной выработки и уменьшения количества поглотителей $O_2^{\bullet-}$ может взаимодействовать с сульфгидрильными группами белков и ближайших ферментов, приводя к их инактивации и инициации каскада окислительных событий, главным образом посредством реакции Фентона-Габера-Вайсса. Также он может мобилизовать железо из внутриклеточных резервов ферритина (Brent and Rumack, 1993). Этот дигидроксифенол (КМ-34) мог предотвращать повреждение, вызываемое $O_2^{\bullet-}$, и образование ОН более реактивным образом.

Защитное действие КМ-34 на распад 2-дезоксидеокси-О-рибозы

Для оценки защитного действия КМ-34 на окислительный распад ДР (продукт действия радикалов ОН $^{\bullet}$) на графике фиг. 3 приведены результаты, соответствующие концентрациям 28 мМ ДР. Полученные значимые результаты (* $P < 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем) при концентрациях КМ-34 более 10 мкМ.

Процесс образования радикалов ОН $^{\bullet}$, а также повреждения, причиняемого ДР, происходит посредством следующих реакций (Pardo et al., 2006):



Таким образом мы можем понять уровни, на которых может действовать КМ-34, которые демонстрировали ингибирование образования основного продукта распада ДР, МДА (отслеживаемого спектрофотометрически на 532 нм), со значениями 10-100 мкМ вне зависимости от используемых концентраций ДР. Хотя предыдущие исследования продемонстрировали восстановительную способность КМ-34 в отношении радикалов.

ДФПГ и $O_2^{\bullet-}$, что также можно было ожидать для радикалов $\bullet\text{ОН}$, этот анализ позволяет предположить, что в системах, в которых выработка АФК (активных форм кислорода) опосредована железом, (Pardo et al., 2006). Однако невозможно прогнозировать образование этих соединений посредством координирования металла. Это соединение имеет в своей структуре катехольные группы, кетонные группы и ненасыщенные фрагменты, которые могут вносить свой вклад в антиокислительную активность посредством связывания железа (Perron and Brumaghim, 2009). Высокая константа образования комплекса $\text{Fe}^{3+}\text{-ЭДТА}$ ($\log K = 25,5$) может в некоторой степени предотвращать его вытеснение КМ-34, однако константа образования комплекса $\text{Fe}^{2+}\text{-ЭДТА}$ приблизительно в половину меньше, чем для комплекса $\text{Fe}^{3+}\text{-ЭДТА}$, что может быть достаточно, чтобы КМ-34 мог стимулировать самоокисление Fe^{2+} (Pardo et al., 2006), предотвращая участие этого металла в реакциях Фентона-Габера-Вайсса. С другой стороны, экспериментальные исследования, проводимые в LSO, демонстрируют наличие взаимодействия КМ-34 с H_2O_2 , приводящее к образованию стабильных эпоксидов (неопубликованные результаты). Это может объяснять другой вариант ингибирования реакции Фентона КМ-34.

Спектрофотометрические данные по взаимодействию между КМ-34 и Fe^{2+}

Чтобы подтвердить существование возможных взаимодействий между КМ-34 и Fe^{2+} (по изменениям в их спектрах), получали следующие результаты:

По экспериментальным результатам, приведенным на графике (фиг. 4), можно видеть, что поглощение КМ-34 в заданных максимумах поглощения 262, 345 и 472 (нм соответственно) меняется с повы-

шением концентрации ионов двухвалентного железа. Это может указывать на возможные взаимодействия между Fe^{2+} и КМ-34, в которых ион стабилизируется в виде Fe^{3+} ненасыщенными лигандами благодаря стабилизации более сильного кристаллического поля от электронной конфигурации d^6 (Fe^{2+}) до d^5 (Fe^{3+}) (Hider et al., 1981, Hider et al., 1983). Это подтверждает данные, полученные в исследовании окислительного распада ДР, в котором наблюдали, что КМ-34 в этих условиях, вероятно, действует скорее в качестве координатора Fe^{2+} , чем поглотителя $\bullet\text{ОН}$. Этот результат был бы очень хорошим, если считать, что Fe^{2+} активно участвует в процессе, в котором происходит образование АФК в ходе реакции Фентона-Габера-Вайсса (Pardo, 2007), если бы КМ-34 мог поддерживать контроль ионов посредством хелатирования, риск образования АФК был бы меньшим.

Действие КМ-34 на спонтанное или индуцированное Fe^{3+} /АК ПОЛ в гомогенате головного мозга крыс

Гомогенат головного мозга богат фосфолипидами, которые подвергаются спонтанному или индуцированному самоокислению в присутствии FeCl_3 и АК, причем последняя окисляется за счет восстановления металла и, таким образом, железо становится доступным для катализа реакции Фентона-Габера-Вайсса (Hiroi et al., 2005; Koonsumchoo, 2005). Действие КМ-34 на эти процессы показано на фиг. 5. Соединение в значимой степени ингибировало ($p < 0,05$) спонтанное ПОЛ (пероксидное окисление липидов), индуцированное смесью Fe^{3+} /АК, в концентрациях выше 0,1 и 10 мкМ соответственно по сравнению с реакцией без ингибирования.

В последние 3 десятилетия ПОЛ считается важным явлением как с физиологической, так и с патофизиологической точки зрения. Повышение ПОЛ считается важной и существенной причиной инициации ОС (окислительного стресса), связанного с повреждением некоторых тканей, гибелью клеток и дополнительным прогрессированием многих острых и хронических заболеваний. МДА, являющийся токсичным и мутагенным в высоких концентрациях, и гидроксиалкины (НАЛ) являются конечными продуктами и маркерами ПОЛ (Leon, 2010). Ранее полученные результаты показывали, что КМ-34 способен ингибировать спонтанный окислительный процесс, предупреждая образование МДА в концентрациях выше 1 мкМ.

В действительности, как и ожидалось, этот аспект дополнительно подтвердился, когда была продемонстрирована потенциальная способность этого полифенола изолировать радикалы в виде ДФПГ и O_2^- , что позволяет предположить, что КМ-34 может захватывать другие радикалы, генерируемые во время ПОЛ, такие как липопероксил ($\text{LOO}^\bullet$) и алкоксил ($\text{LO}^\bullet$), действуя как разрывающий цепи антиоксидант. В случае ПОЛ, катализируемого смесью Fe^{3+} /АК (100 мМ), хотя ингибирование может быть менее заметным (от 10 мкМ КМ-34), это также является значимым результатом, если считать, что окислительный процесс повышен. АК восстанавливает Fe^{3+} до Fe^{2+} , состояния, в котором он может участвовать в образовании радикалов ОН посредством химической реакции Фентона-Габера-Вайсса. Эти радикалы способны удалять атом водорода из полинасыщенной жирной кислоты (ЛН) и инициировать окислительное повреждение (Hiroi et al., 2005; Koonsumchoo, 2005). В этом случае результаты позволяют предположить, что в дополнение в прямой изоляции образуемых радикалов может существовать взаимодействие между КМ-34 и железом, что, таким образом, предотвращает его участие в этапах инициации и распространения пероксидного окисления, поддерживая его комплекс в форме, неактивной с точки зрения окислительно-восстановительных реакций.

Защитное действие КМ-34 против воздействия L-глутамата

Процесс эксайтотоксичности определяется как нейрональное повреждение вследствие избыточной активации глутаматергических рецепторов. Поступление высоких уровней Ca^{2+} после активации рецепторов стимулирует активацию ферментов, таких как синтаза оксида азота (NOS), что приводит к генерации АФА/АФК в высоких концентрациях, приводя к клеточной гибели (Nakamura and Lipton, 2010; Yang et al. [Ссылки] [Статья на испанском] Torregrosa G, et al., 2009). Высокие уровни глутамата или других возбуждающих аминокислот вовлечены в поглощение цистеина (важного для синтеза антиоксидантов, таких как СОД (супероксиддисмутаза)), что снижает антиокислительную защиту нейронов против окислительных процессов (Emerit et al., 2004; 2004).

Результаты, полученные во многих моделях эксайтотоксичности, указывают, что глутамат значительно ингибирует ($P < 0,01$) жизнеспособность клеток, что позволяет выявлять изменения клеточной морфологии (микроскопические) в присутствии этого НТ (Yang et al., 2010). В связи с этим на фиг. 6 приведены результаты, полученные в эксперименте, проводимом с 50 мМ L-глутамата, для демонстрации цитопротекторного действия КМ-34. Это соединение в концентрациях более 0,01 мкМ и в присутствии L-глутамата значительно ингибирует повреждение клеток ($P < 0,01$) по сравнению с отрицательным контролем. При значениях выше 1 мкМ КМ-34 цитопротекторный ответ превышает 80%.

Повышенная выработка АФА/АФК является одним из механизмов, опосредующих процесс клеточной эксайтотоксичности, вызываемой высокими концентрациями глутамата (Yang et al., 2010). Предыдущие исследования продемонстрировали способность КМ-34 захватывать радикалы, а результаты, полученные в этом исследовании являются другим примером этого явления, когда КМ-34 мог захватывать АФА/АФК, позволяя избежать вызываемого ими повреждения при эксайтотоксичности. Другими меха-

низмами, предположительно вносящими свой вклад в высокую цитопротекторную способность, демонстрируемую КМ-34, и которые были описаны для других типов полифенолов, являются возможная активация антиокислительных ферментов, а также ингибирование NADPH-оксидазы, которая заметно усиливает окислительные процессы (Kovacsova et al., 2010).

Цитопротекторное действие КМ-34 против повреждения, индуцированного H_2O_2

H_2O_2 образуется *in vivo*, спонтанно или ферментативно. В низких концентрациях он может иметь плохую реактивность, однако в высоких концентрациях он может взаимодействовать с системами генерации энергии клеток и инактивировать их. Кроме того, H_2O_2 способен окислять -SH-группы белков и приводить к разрыву цепей ДНК. Его наиболее вредным действием является образование $\bullet OH$, катализируемое переходными металлами, посредством реакции Фентона-Габера-Вайсса (Martinez, 2005). Это лежит в основе использования H_2O_2 в данном исследовании с целью выяснения, способен ли КМ-34 обрабатывать повреждения, вызванные этим химическим агентом. На фиг. 7 приведены полученные результаты, демонстрирующие, что концентрации КМ-34 выше 5 мкМ обеспечивали значительное действие на клеточную выживаемость, достигая значений ответа более 50% для 25 мкМ КМ-34.

Некоторые экспериментальные результаты четко показывают, что H_2O_2 является медиатором множества физиологических явлений, а его избыток приводит к множеству патологических состояний (Lean, 2010). Это химическое соединение может быть вовлечено в образование других АФК, что таким образом, повышает его вредное действие, что приводит к тому, что антиокислительные соединения, такие как КМ-34, играют ключевую роль в регуляции повреждения. Результаты, полученные во время этого исследования, демонстрируют это, так как в концентрациях выше 5 мкМ КМ-34 повышал жизнеспособность клеток PC12, которые подвергали воздействию 150 мкМ H_2O_2 . В концентрациях выше 50 мкМ % выживаемости клеток был близок к 90.

Поглощение радикалов может быть основным механизмом, посредством которого КМ-34 проявляет свое защитное действие в этой модели, снова демонстрируя восстановительный потенциал КМ-34 против молекул радикалов, таких как $O_2^{\bullet}$, образуемых из H_2O_2 . Ввиду взаимодействия между КМ-34 и H_2O_2 (результат, обсуждаемый в исследовании ДР) можно объяснить ингибирование реакции Фентона-Габера-Вайсса КМ-34 в дополнение к повреждениям, вызываемым самим H_2O_2 .

Защитное действие КМ-34 против повреждения, индуцированного $FeSO_4/AK$

Система $FeSO_4/AK$ является сильным катализатором окислительных реакций в клетках, таких как PC12, приводящих к их гибели (Hiroi et al., 2005; Nunez et al., 2007): КМ-34 в присутствии этой проокислительной системы демонстрировал цитопротекторное действие в концентрациях выше 0,001 мкМ. В концентрациях выше 1 мкМ % выживаемости клеток превышала 90% (фиг. 8).

Эти результаты демонстрируют потенциальную защитную способность КМ-34, который в концентрациях 0,01-10 мкМ позволяет достичь выживаемости 90 из 100 клеток в окислительных условиях. Эти результаты подтверждают, что КМ-34 может действовать посредством нескольких механизмов, что усиливает его антиокислительные свойства.

Это может быть поглощение радикалов и хелатирование железа, что уже упоминалось несколько раз, и может быть основано на структурных характеристиках (наличии хромофорных групп) КМ-34. Это соединение может снижать количество радикалов, генерируемых в реакции Фентона-Габера-Вайсса, так как фенольные соединения проявляют себя как превосходные доноры электронов (Vermerris and Nicholson, 2006). С другой стороны, хелатирование металлов, таких как железо, посредством катехольных групп и ненасыщенных фрагментов, присутствующих в молекуле (Perron and Brumaghim, 2009), в дополнение к инактивации H_2O_2 , может позволить избежать катализа указанной реакции. Если после координирования металла он является каталитически активным, образование радикалов будет происходить вблизи полифенола и они будут немедленно изолироваться. Растущее число исследований показывают, что катехольное взаимодействие металл-полифенол повышает антиокислительную и цитопротекторную способность последнего, главным образом вследствие приобретения лигандом нового окислительно-восстановительного центра, который имитирует антиокислительные ферменты, такие как СОД (Pardo, 2007; Nunez et al. Тот факт, что КМ-34 оказывает цитопротекторное действие в концентрациях до и даже близко к значению полной защиты, позволяет предположить, что это соединение также может действовать посредством другого более эффективного молекулярного механизма, такого как модуляция генной экспрессии, предполагаемая для других связующих агентов с антиокислительными свойствами, таких как ДФО (дефероксамин), который ингибирует активацию NF- κ B и стабилизирует HIF-1 α , таким образом усиливая ответы клеточной выживаемости (Kooncumchoo, 2005; Harten et al., 2010). Если этот последний механизм можно было бы надлежащим образом исследовать для КМ-34, это имело бы большое значение для применения данного полифенола в *in vivo* системах, учитывая, что антиокислительного действия на основе изоляции реактивных соединений может быть недостаточно для предотвращения окислительного повреждения при высоких концентрациях клеточных биомолекул (Halliwell et al., 1991). Уровни железа с каталитической способностью в отношении образования АФК (связанных с цитратом, АТФ и другими низкомолекулярными соединениями) даже в ситуациях с аномальным накоплением железа едва превышают 1-2 мкМ, то есть, концентрации, которые могут хелатироваться полифенолами

(Halliwell et al., 1991).

В свете полученных результатов не было бы нереалистично думать о более глубоких исследованиях с перспективой будущей реализации этого соединения в терапии патологических процессов, связанных с перенасыщением железом и окислительным стрессом, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, амиотрофический боковой склероз, ишемия, среди прочих.

Пример 9. Антипаркинсоническая активность КМ-34.

Чтобы провести одностороннюю дофаминергическую денервацию стриатума (правое полушарие), крыс анестезировали хлоральгидратом [0,4 г/кг массы тела, в/б, Merck (Darmstadt, Germany)] и помещали в раму, сконструированную для стереотактической хирургии (Stoelting Instruments, USA), инъецировали в компактную часть черного вещества с правой стороны нейротоксин 6-OHDA-HBr (8 мкг/3 мкл солевого раствора, который также содержал 0,2 мг/мл аскорбиновой кислоты в качестве антиоксиданта). Координаты рассчитывали, используя стандартную точку брегмы в соответствии с атласом Паксиноса и Уотсона: AP: -4,4 мм; ML: 1,2 мм; DV: 7,8 мм и линия разреза: -2,4 мм ниже межшнурной линии. После размещения медленно инъецировали нейротоксин со скоростью потока 1 мкл/мин с помощью шприца Гамильтона (5 мкл), который держали *in situ* в течение 5 мин. После этого инъекция была завершена.

IV. Поведенческие тесты А.

Тест с цилиндром

В этом тесте крысу помещали внутрь прозрачного акрилового цилиндра диаметром 20 см и высотой 30 см, которая не позволяла животному достать до края. Цилиндрическая форма способствует естественному проведению вертикального исследования стенки передними лапами при помещении крысы в неизвестное ей место. После размещения животного подсчитывают количество прикосновений, совершаемых животным обеими передними лапами, правой или левой, всего до 20 прикосновений к стенке контейнера в расчете на животное.

Животные с односторонним повреждением 6-OHDA демонстрировали тенденцию к использованию лапы, противоположной стороне с меньшим повреждением, в нашем случае - левой лапы. % асимметрии, демонстрируемый каждым животным, рассчитывали с помощью следующей формулы:

$$\frac{(\% \text{ ипсилатеральных касаний}) - (\% \text{ контрлатеральных касаний})}{(\% \text{ асимметрии})}$$

В. Исследовательская активность.

Чтобы оценить вертикальную исследовательскую активность животных, использовали тест на исследовательскую активность, в котором животных помещали в прозрачный плексигласовый бокс с размерами 41×41×33 (выс.) см. (UGO BASILE, Multiple Activity Cage Cat. 47420). Бокс стоял на жестком основании, сделанном из черного плексигласа, оснащенном четырьмя вертикальными стальными стержнями со стальными насечками так, чтобы корректно фиксировать горизонтальную/вертикальную системы детекции. Датчики представляют собой системы ИК-излучения, способные регистрировать движения животных, например, вертикальное исследование. Данные отслеживают на компьютере. Животное помещают в центр бокса так, чтобы оно могло его исследовать. Бокс на 5 мин помещают в комнату, изолированную от исследователя и внешних шумов и имеющую в дополнение слабое освещение. Исследователь записывает количество раз, которое животное вертикально исследует стенки бокса, прерываемое лучами света от датчика бокса.

Результаты

Нейропротективное действие КМ-34 в *in vivo* модели болезни Паркинсона, индуцированной нейротоксином 6-OHDA

Животные, обработанные дозой 2 мг/кг и 1 мг/кг, имели % асимметрии, одинаковый со здоровыми животными, когда их оценивали в тесте с цилиндром, таким образом, животных не обрабатывали дозой 0,5 мг/кг КМ-34. Животные из контрольной группы (6-OHDA), которые не проходили обработку, при оценке в тесте с цилиндром не могли использовать лапу, противоположную стороне с индуцированным 6-OHDA повреждением, приводящим к сильной денервации дофаминергических клеток, присутствующих в черном веществе, поэтому они демонстрировали такой высокий % асимметрии. При повышении дозы соединения животные восстанавливались от повреждения до достижения максимального нейропротективного действия в группе, обработанной 2 мг/кг, статистически значимого по сравнению с контрольным повреждением. Животные, обработанные 0,5 мг/кг, не демонстрировали статистически значимой разницы по сравнению с группой с повреждением и без обработки, хотя наблюдали некоторую тенденцию к снижению повреждения. Животные, в группе обработки базовым раствором не демонстрировали повреждения (фиг. 9).

С другой стороны, вертикальное исследовательское поведение, оцениваемое в исследовательском боксе, не показало наличия статистически значимой разницы для доз 0,5 и 1 мг по сравнению с животными с повреждением, но не в случае с животными, обработанными максимальной дозой, которые демонстрировали статистически значимую разницу по сравнению с животными с повреждением и не демонстрировали разницу по сравнению с животными в группе обработки базовым раствором. Существует тенденция к повышению вертикального исследования для трех исследованных доз при повышении дозы

КМ-34, при этом максимум приходится на дозу 2 мг/кг КМ-34, фиг. 10.

Пример 10. Антидеменционная активность КМ-34.

Модель деменции, индуцированной скополамином, широко используется для поиска эффективных соединений для лечения разных типов деменции, включая болезнь Альцгеймера. Результаты оценки КМ-34 в этой модели демонстрируют нейропротективные свойства этой молекулы при лечении деменции.

Экспериментальный дизайн

В *in vivo* моделях КМ-34 вводили перорально (п/о) в количестве 4 мл/кг массы тела. Дозы, составляющие 2, 4 и 8 мг/кг, оценивали в виде однократного приема за 90 мин до начала проведения поведенческих тестов. Для введения соединения суспендировали в карбоксиметилцеллюлозе (КМЦ), 0,05%. Скополамин бромид растворяли в 0,9% солевом растворе и вводили внутривентрикулярно в виде одной дозы (1, 4 мл/кг массы тела) за 30 мин до начала проведения поведенческих тестов.

Животных случайным образом отбирали и распределяли по 5 экспериментальным группам с разной обработкой ($n = 7$ на группу): контрольная группа (КМЦ и солевой раствор), группа базового раствора (КМЦ и 1 мг/кг скополамина), КМ-34 (4 мг/кг КМ-34 и 1 мг/кг скополамина) и (8 мг/кг КМ-34 и 1 мг/кг скополамина).

Поведенческие исследования

Т-образный лабиринт

Спонтанные изменения

Оценку спонтанных изменений в поведении в Т-лабиринте проводили согласно методологии, предложенной Capurro et al. (Capurro et al., 2013). Этот опыт включает одну этап, который начинается принудительным выбором входа, за которым следует 14 свободных выборов входа в любой из левого или правого рукавов лабиринта. При первом входе доступ в правый рукав лабиринта был закрыт, принуждая животное открывать (левый) рукав. После этого животному позволяли свободно исследовать лабиринт и выбирать, в какой из рукавов, правый или левый, заходить, с 14 попытками. После каждого выбора животное возвращали в начальное положение (конец длинного рукава Т), где его держали в течение 5 с. Записывали ряд входов в каждый рукав и рассчитывали процент изменения следующим способом: (число сделанных изменений/общее число возможных изменений)×100. Этот тест проводили через 90 и 30 мин после введения КМ-34 и скополамина соответственно.

Распознавание объектов

Это исследование проводили так, как было предложено Capurro et al. (Capurro et al., 2013), в открытом поле в течение двух последовательных дней. На первый день животные привыкали к исследованию в течение 3 мин в 2 этапа. На второй день проводили тренировку и оценку обучения на двух этапах по 5 мин каждый, тест 1 (P1) и тест 2 (P2) соответственно. Перед началом P1 животным вводили КМ-34 и скополамин, за 90 и 30 мин соответственно. На этапе P1 крысам представляли два идентичных объекта, называемых знакомыми объектами (F). Через 30 мин начинали P2 и предъявляли крысам два разных объекта: знакомый F и новый объект (N). Тесты записывали на видео для анализа исследования объектов, определяя время исследования, которое животное тратило на каждый объект. Уровни различения между объектами F и N рассчитывали как: $ID = (N - F) / (N + F)$.

Статистический анализ

Для статистического анализа полученных результатов использовали программу GraphPad Prism 5.0. Проверяли нормальность и гомоскедастичность экспериментальных данных. Проводили ANOVA (дисперсионный анализ в соответствии с русской терминологией) и использовали критерий Тьюки для множественного сравнения для сравнения разных экспериментальных групп.

Результаты

В Т-лабиринте оценивали действие разных вариантов обработки на краткосрочную пространственную память. Процент изменений положительно коррелирует с когнитивной способностью и нормальной памятью животных. Введение 2, 4 и 8 мг/кг КМ-34 (п/о) за 1 ч до индукции когнитивного расстройства скополамином значительно ($p < 0,01$) защищало от нарушений пространственной памяти по сравнению с животными, не обработанными КМ-34 (фиг. 11).

Действие КМ-34 на эпизодическую память распознавания объектов оценивали с помощью теста на распознавание новых объектов в краткосрочном дизайне. В этом тесте оценивали время распознавания знакомого (F) и нового (N) объектов во время фазы оценки и рассчитывали индекс различения (ID) между двумя объектами. Высокий положительный индекс отображает хорошую память распознавания объекта N в сравнении с F, что наблюдалось в контрольной группе (фиг. 12). Индекс со значением, близким к нулю или отрицательным, означает, что животные плохо различают объекты F и N или больше исследуют объект F, чем N. В этих тестах наблюдали, что дозы 2 и 8 мг/кг КМ-34 (п/о) были способны обращать индуцированное скополамином негативное влияние на обучение и память в контексте распознавания. Животные, обработанные КМ-34, были способны различать предварительно известный и новый объекты так же, как и контрольные животные в эксперименте, и на значительно ($p < 0,01$) высшем уровне, чем животные, обработанные одним скополамином (фиг. 11). Эти результаты прогнозируют возможное антиамнестическое действие КМ-34. Структурные возможности КМ-34 и ряд полученных фармако-

логических данных подтверждают возможность того, что КМ-34 имеет нейропротективное действие при лечении разных типов деменции, включая болезнь Альцгеймера.

Пример 11. Антиишемическая активность km-34

Животных случайным образом делили на следующие группы ($n = 8$ на группу): (1) обрабатываемые базовым раствором контрольные животные с ишемией/реперфузией (И/Р), (2) обрабатываемые 0,1 мг/кг КМ-34 И/Р, (3) обрабатываемые 0,5 мг/кг КМ-34 И/Р, (4) обрабатываемые 1 мг/кг КМ-34 И/Р, (5) ложно-прооперированные обрабатываемые базовым раствором животные и (6) ложно-прооперированные обрабатываемые 1 мг/кг КМ-34. Во всех случаях обработку вводили перорально (с помощью внутрижелудочной канюли). В случае разных доз концентрации доводили с целью введения одинакового объема 10 мл/кг. Непосредственно перед применением КМ-34 суспендировали в карбоксиметилцеллюлозе (КМЦ), 0,05%.

Индукция временной фокальной церебральной ишемии у крыс

Фокальную церебральную ишемию индуцировали ОАСМ, используя метод интралиминального введения филамента. Вкратце, животных анестезировали кетаминном (75 мг/кг) и ксилазином (8 мг/кг). Открывали доступ к правой общей сонной артерии, делая продольный надрез передней центральной линии шеи и перевязывали общую и наружную сонные артерии шелковой нитью 3-0. После этого вводили нейлоновый монофилament 4-0 (Somerville, Brazil) с закругленным концом и покрывали поли-L-лизинном (44), до 18-20 мм в длину через ВСА, с целью блокирования начала ОСА. Через 90 мин окклюзии филament удаляли для реперфузии. Температуру тела поддерживали между 36,5°C и 37,5°C с помощью одеяла с подогревом. Через час крысы получали одну пероральную дозу КМ-34 (0,1, 0,5 или 1 мг/кг). Животных в ложной группе (ложно-прооперированных) подвергали такой же хирургической процедуре, но без введения монофилamenta. Через 23 ч после реперфузии оценивали неврологический дефицит и умерщвляли животных, чтобы определить объем инфаркта и провести поведенческие оценки.

Оценка неврологического дефицита

Неврологический дефицит оценивали по шестибальной шкале: 0 = отсутствие наблюдаемого неврологического дефицита; 1 = отсутствие удлинения левой передней лапы; 2 = движение кругами влево при подвешивании животного за хвост; 3 = спонтанное смещение кругами влево; 4 = отсутствие спонтанной двигательной активности со снижением уровня сознания; 5 = смерть. Измерение инфаркта головного мозга проводили путем окрашивания ТТХ, бесцветным соединением в растворе, которое при восстановлении дегидрогеназами функциональных митохондрий образует кирпично-красную формазановую соль. Таким образом, ткань, поврежденная ишемией, остается неокрашенной, и ее можно распознать макроскопически.

После неврологической оценки животных снова анестезировали и проводили транскардиальную перфузию 20 мл солевого раствора при 4°C. Головной мозг изымали и помещали в условия с температурой 0°C на 30 мин. Затем получали коронарные срезы толщиной 2 мм и инкубировали в 2% растворе ТТХ при 37°C в течение 30 мин. Окрашенные срезы фиксировали в растворе 4% забуференного фосфата формалина и оцифровывали для определения размера инфаркта с помощью системы для анализа изображений (ImageJ 1.41, National Institute of Health, USA). Индекс отека (объем полушария, ипсилатерального к ОАСМ/объем контрлатерального полушария) и скорректированный объем инфаркта (объем поражения/индекс отека) рассчитывали, чтобы избежать переоценки объема инфаркта по отеку головного мозга. Объем инфаркта выражали в виде процента от контрлатерального полушария.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили, используя программное обеспечение GraphPadPrism 5.0 (Graph-Pad Software Inc., USA). Данные выражали в виде среднего $\pm$ СПС (стандартная погрешность среднего). Сравнение между разными группами проводили, используя простой классификационный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим использованием критерия множественных сравнений Ньюмана-Кейлса. Статистически значимым считали значение $p < 0,05$. Весь анализ проводился исследователем, который не знал о распределении экспериментальных групп.

Результаты

Обработка КМ-34 снижала объем инфаркта и неврологический дефицит, индуцированные окклюзией средней мозговой артерии у крыс.

Модель окклюзии средней мозговой артерии у крыс является надежной и воспроизводимой моделью, которая приводит к хорошо изученному сенсомоторному и когнитивному дефициту. Соединение вводили перорально (используя внутрижелудочную канюлю) в дозах 0,1, 0,5 и 1 мг/кг через 1 ч после реперфузии. Окрашивание ТТХ продемонстрировало, что КМ-34 сильно снижает размер инфаркта (фиг. 13А). Количественный анализ этих данных выявил, что общий объем инфаркта (выраженный в виде процента от контрлатерального полушария) у крыс, обработанных 0,5 и 1 мг/кг КМ-34, значительно снижался ($p < 0,05$) по сравнению с группой, обработанной базовым раствором (27,5% в группе, обработанной базовым раствором, на 15,7 и 5,3% соответственно) (фиг. 13В). Это общее действие является результатом снижения размера инфаркта головного мозга в областях коры головного мозга, например, в подкорковой области.

В случае нейрологической оценки в ложно-прооперированной группе не наблюдали значительных поведенческих отклонений (результаты не показаны), тогда как в группе, не обработанной КМ-34 и подвергнутой воздействию ОСМА, наблюдали тяжелый нейрологический дефицит (фиг. 13С). Крысы в этой группе демонстрировали движения кругами, растяжение передней лапы, контрлатеральной повреждению, и снижение спонтанных движений.

Обработка КМ-34 (0,5 и 1 мг/кг) значительно улучшала ($p < 0,05$) нейрологический дефицит, что отображается снижением нейрологической оценки. В обоих случаях аномалии в движении и позе крыс были ниже, что позволяет предположить снижение размера инфаркта вследствие обработки оказывало положительное действие на постишемический нейрологический дефицит. С другой стороны, введение этого соединения не вызывало признаков повреждения тканей или поведенческих изменений в ложно-прооперированной группе, что указывает на то, что данное соединение не влияет на эти параметры в базовых условиях (без ОСМА).

Пример 15. Биологическая активность комбинаций трициклических производных соединений типа бензодиазепинов, пиридопиазепинов и пиримидодиазепинов, конденсированных с производными 1,4-дигидропиридинов, комбинируемых с фенольными или полифенольными производными.

Чтобы продемонстрировать превосходство комбинации трициклических и тетрациклических производных соединений типа бензодиазепинов, пиридопиазепинов и пиримидодиазепинов, конденсированных с производными 1,4-дигидропиридинов с фенольными или полифенольными производными, по сравнению с каждой из этих систем в отдельности, культуры клеток PC12 подвергали повреждению, вызываемому глутаматом и пероксидом водорода. Повреждения, вызываемые пероксидом водорода (радикальное повреждение) и глутаматом (эксайтотоксичное), являются типовыми для большинства сосудистых и нервных расстройств. На обоих графиках можно видеть, что группы, обработанные JM-20 + КМ34, демонстрировали больший процент выживаемости, чем демонстрировался каждым из них в отдельности. Это указывает на то, что смесь обоих соединений превосходит в контексте терапевтической эффективности применение по отдельности, также это позволяет предположить, что побочные явления (являющиеся причиной изъятия многих лекарств из клинической практики) будут меньшими при комбинировании производных трициклических и тетрациклических бензодиазепинов, пиридопиазепинов и пиримидодиазепинов, комбинируемых с производными 1,4-дигидропиридинов с фенольными или полифенольными производными, вследствие необходимости более низких доз для достижения превосходящего фармакологического действия.

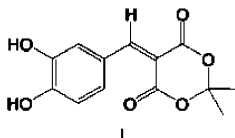
В качестве модели сосудистой деменции животных (самцов швейцарских мышей-альбиносов) подвергали временной окклюзии общих сонных артерий в течение 20 мин и оценивали когнитивное нарушение с помощью анализа с использованием лабиринта Морриса. Результаты показывают, что животные, которым вводили 4 мг/кг JM-20 (п/о) через 1 ч после начала реперфузии и на протяжении всех суток исследований, демонстрировали значительно ($p < 0,05$) уменьшенное время латентной задержки по сравнению с необработанными животными. Комбинация JM-20 (4 мг/кг) + КМ-34 (2 мг/кг) продемонстрировала улучшение сосудистой деменции большее, чем такрин 8 мг/кг. В качестве модели перманентной кортикальной ишемии индуцировали термокоагуляцию пиальных артерий и проводили количественную оценку процента асимметрии.

На фиг. 14 показано, что комбинация JM-20 (4 мг/кг) + КМ-34 (2 мг/кг) снижала асимметрию у пораженных животных более эффективно, чем каждое из соединений в отдельности.

В случае деменции и болезни Паркинсона комбинация JM-20 + КМ-34 также значительно усиливала нейропротективное действие каждой из этих молекул в отдельности. Это позволяет применять более низкие дозы для достижения превосходящего действия и снижает риск появления нежелательных реакций.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, характеризующаяся тем, что она содержит в качестве фармацевтически активного ингредиента фенольное соединение формулы I



вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами для лечения заболеваний сосудистой и центральной нервной системы.

2. Комбинация соединения формулы I, как определено по п.1 с 3-этоксикарбонил-2-метил-4-(2-нитрофенил)-4,11-дигидро-1H-пиридо[2,3-b][1,5]бензодиазепином для лечения заболеваний сосудистой и центральной нервной системы.

3. Комбинация по п.2, отличающаяся тем, что 3-этоксикарбонил-2-метил-4-(2-нитрофенил)-4,11-дигидро-1H-пиридо[2,3-b][1,5]бензодиазепин находится в форме рацемата или в форме его правовра-

шающего или левовращающего энантиомера.

4. Фармацевтическая композиция, содержащая в качестве фармацевтически активного ингредиента комбинацию по п.2 или 3 вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами для лечения заболеваний сосудистой и центральной нервной системы.

5. Фармацевтическая композиция по п.1 или 4 для лечения ишемии головного мозга, болезни Паркинсона и разных типов деменции.

6. Применение соединения формулы I, как определено по п.1 для лечения заболеваний сосудистой и центральной нервной системы.

7. Применение комбинации по п.2 или 3 для лечения заболеваний сосудистой и центральной нервной системы.

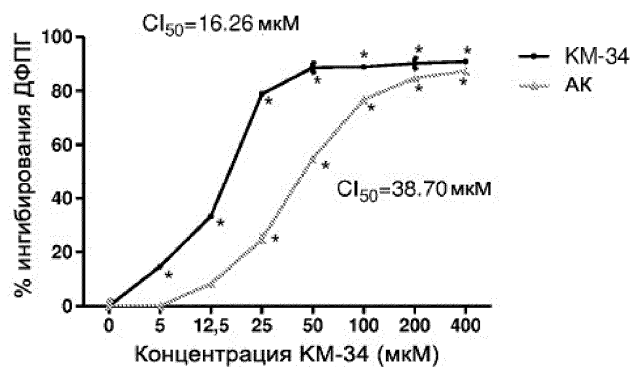
8. Применение комбинации по п.7, отличающееся тем, что упомянутое заболевание представляет собой ишемию головного мозга.

9. Применение комбинации по п.7, отличающееся тем, что упомянутое заболевание представляет собой болезнь Паркинсона.

10. Применение комбинации по п.7, отличающееся тем, что упомянутое заболевание связано с разными типами деменции.

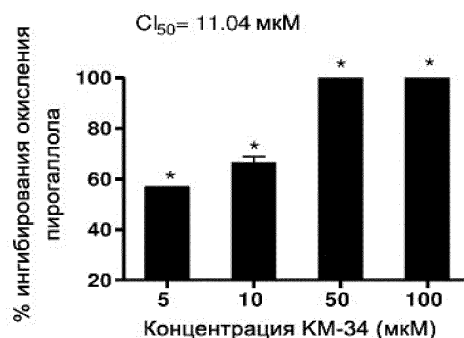
11. Применение комбинации по п.10, отличающееся тем, что деменция представляет собой болезнь Альцгеймера.

12. Применение комбинации по п.10, отличающееся тем, что деменция представляет собой сосудистую деменцию.



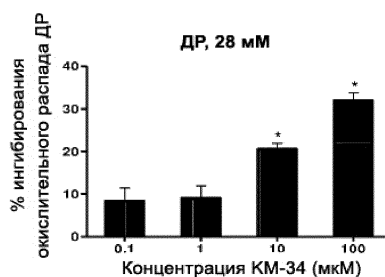
Фиг. 1

Процентное снижение ДФПГ (100 мкМ) КМ-34 (5-400 мкМ) определяли, изменяя поглощение на 550 нм относительно образца, содержащего только ДФПГ и базовый раствор (нулевая концентрация КМ-34 или АК), через 30 мин реакции. Значения выражены в виде среднего $\pm$ CO (n = 3). *P < 0,05 по сравнению с базовым раствором.



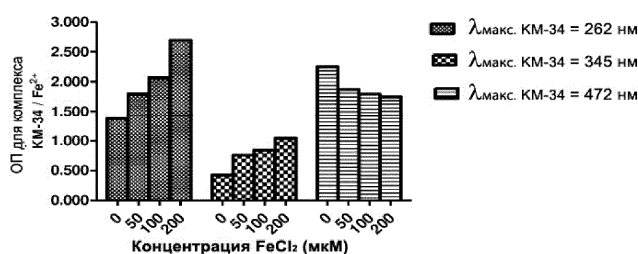
Фиг. 2

Активность КМ-34 (5-100 мкМ) в качестве поглотителя свободных радикалов O₂⁻, выраженная в виде процента ингибирования самоокисления пирогаллола. Аналогичные результаты были получены путем изменения поглощения на 420 нм в течение 1 мин по сравнению с контролем (реакция без ингибирования, без КМ-34); наклон рассчитывали для каждой концентрации образца и для образца с R² > 0,98. Реакцию проводят в 50 мМ буфере Трис-HCl, pH 8,2, и инициируют добавлением 0,124 мМ пирогаллола. *P < 0,05 по сравнению с носителем (реакция без ингибирования).



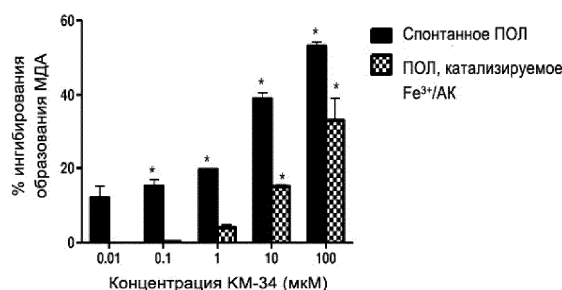
Фиг. 3

Действие КМ-34 (ОД, 1, 10, 100 мкМ) на окислительное повреждение 28 мМ ДР, индуцированное Fe^{3+} -ЭДТА и аскорбатом. Растворы инкубировали 30 мин при 37°C и содержали 10 мМ фосфатного буфера, рН 7,4, 100 мкМ ЭДТА, 25 мкМ FeCl_3 , 28 мМ ДР. Реакции инициировали 100 мкМ АК. Результаты выражены в виде процента ингибирования распада ДР по сравнению с контролем, содержащим только абсолютный этанол, и получены по изменению в поглощении на 532 нм. Планки указывают среднее $\pm$ СП (n = 3). *P < 0,05 по сравнению с контролем.



Фиг. 4

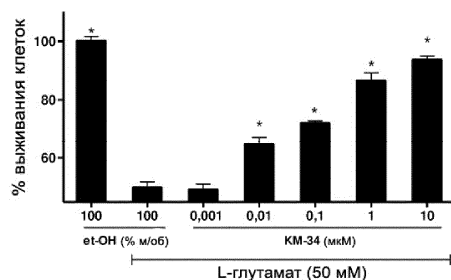
Данные по максимальному поглощению в УФ-видимой области (200-500 нм) 100 мкМ КМ-34 в смеси с 10 мМ фосфатного буфера ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$), рН 7,4, и абсолютного этанола 14:1 (об:об), и поглощению в присутствии FeCl_2 (50, 100 и 200 мМ), растворенного в 10 мМ HCl .



Фиг. 5

Действие КМ-34 (0,01-100 мкМ) на спонтанное пероксидное окисление липидов, индуцированное 100 мМ FeCl_3 и 100 мМ АА. Контроль содержит абсолютный этанол вместо КМ-34. Образцы инкубировали при 37°C в течение 1 ч, а затем проводили количественную оценку уровней МДА по тиобарбитуровой кислоте (ТБК) и определяли поглощение на 532 нм. Значения выражены в виде среднего $\pm$ СО (n = 3).

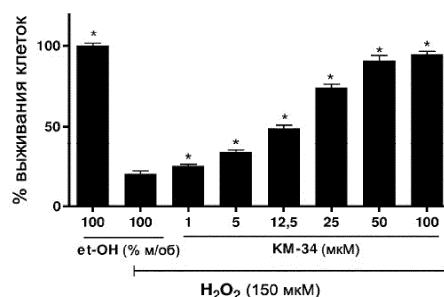
*P < 0,05 по сравнению с базовым раствором.



Фиг. 6

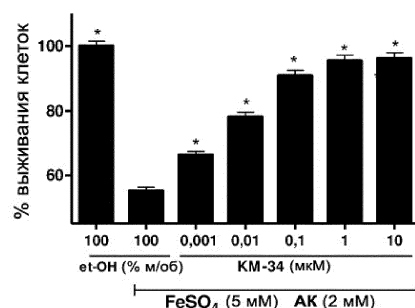
Цитопротекторное действие КМ-34 (0,001-10 мкМ) против повреждения, индуцированного L-глутаматом (50 ммоль/л) в культурах клеток PC12. Жизнеспособность (% живых клеток) определяли в анализе МТТ.

Клетки высевали с плотностью 5×10^5 клеток/мл в 96-луночный планшет. КМ-34 добавляли одновременно с добавлением L-глутамата. Затем культуры оставляли для инкубации при 37°C, 95% O₂ и 5% CO₂ в течение 4 ч. После этого удаляли супернатант и инкубировали клетки с 20 мкг МТТ еще в течение 2 ч и измеряли поглощение на 450 нм относительно 630 нм. Результаты выражены в виде процента живых клеток по сравнению с контролем (клетки без повреждения, 100% живых клеток). *представляет значимую разницу ($p < 0,05$) по сравнению с контрольным L-глутаматом.



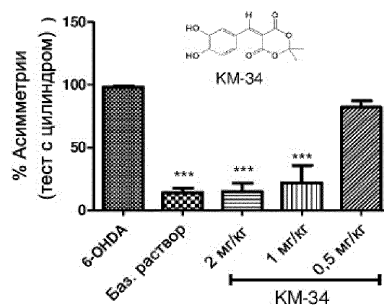
Фиг. 7

Цитопротекторное действие КМ-34 (1-100 мкМ) против повреждения, индуцированного H₂O₂ (150 мкМ) в культурах клеток РС12. Жизнеспособность (% живых клеток) определяли в анализе МТТ. Клетки высевали с плотностью 5×10^5 клеток/мл в 96-луночный планшет. КМ-34 добавляли одновременно с добавлением смеси H₂O₂. Затем культуры оставляли для инкубации при 37°C, 95% O₂ и 5% CO₂ в течение 4 ч. После этого удаляли супернатант и инкубировали клетки с 20 мкг МТТ еще в течение 2 ч и измеряли поглощение на 450 нм относительно 630 нм. Результаты выражены в виде процента живых клеток по сравнению с контролем (неповрежденные клетки, 100% живых клеток). *представляет значимую разницу ($p < 0,05$) по сравнению с контрольным H₂O₂.



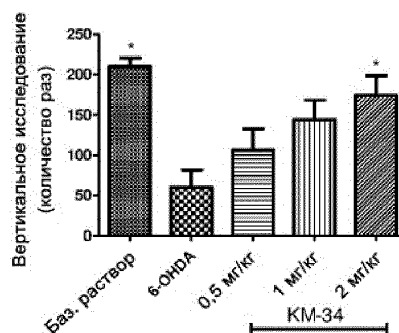
Фиг. 8

Цитопротекторное действие КМ-34 (0,001-10 мкМ) против повреждения, индуцированного FeSO₄ (5 ммоль/л) и аскорбиновой кислотой (АК, 2 ммоль/л) в культурах клеток РС12. Жизнеспособность (% живых клеток) определяли в анализе МТТ. Клетки высевали с плотностью 5×10^5 клеток/мл в 96-луночный планшет. КМ-34 добавляли одновременно с добавлением смеси FeSO₄ и АК. Затем культуры оставляли для инкубации при 37°C, 95% O₂ и 5% CO₂ в течение 4 ч. После этого удаляли супернатант и инкубировали клетки с 20 мкг МТТ еще в течение 2 ч и измеряли поглощение на 450 нм относительно 630 нм. Результаты выражены в виде процента живых клеток по сравнению с контролем (неповрежденные клетки, 100% живых клеток). * представляет значимую разницу ($p < 0,05$) по сравнению с контрольным FeSO₄/АК.



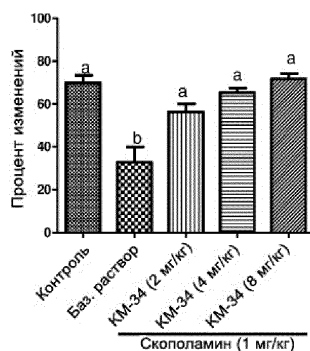
Фиг. 9

Действие КМ-34 на животных с повреждением, вызванным 6-OHDA, тест с цилиндром. На графике проиллюстрированы группы с разной обработкой, оцениваемые через 7 дней после повреждения. В этом случае наблюдали нейропротективную способность доз 2 мг и 1 мг в модели болезни Паркинсона, так как существовала статистически значимая разница по сравнению с животными в отсутствие обработки. Это было не так для дозы 0,5 мг, которая не демонстрировала статистически значимую разницу по сравнению с животными в отсутствие обработки. Значения представляют средний процент асимметрии по сравнению с контрольной группой с повреждением $\pm$ CO. Данные анализировали, используя статистические методы ANOVA и критерий Тьюки * $p < 0,05$.



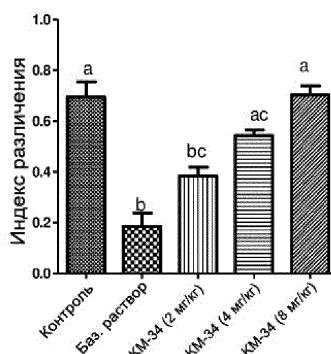
Фиг. 10

Действие КМ-34 на животных с повреждением, вызванным 6-OHDA, исследовательское поведение. На графике проиллюстрированы разные группы обработки, оцениваемые через 7 дней после повреждения. Здесь представлены показатели по вертикальному исследованию для групп с разной обработкой. Группа с повреждением имеет значительно меньшие показатели вертикального исследования, чем обработанная базовым раствором контрольная группа (здоровые животные). При повышении доз КМ-34 наблюдали тенденцию к увеличению показателей вертикального исследования, а для групп, обработанных наибольшей дозой, они были статистически значимыми по сравнению с контрольной группой с повреждением. Значения представляют средний процент асимметрии по сравнению с контрольной группой с повреждением $\pm$ CO. Данные анализировали, используя статистические методы ANOVA и критерий Тьюки * $p < 0,05$. Результаты указывают на потенциальное нейропротективное действие КМ-34 при болезни Паркинсона.



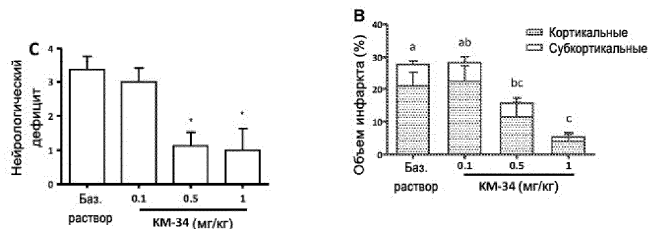
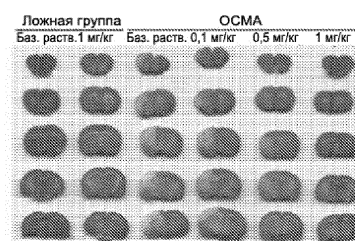
Фиг. 11

Действие КМ-34 на пространственную память. В тесте с использованием Т-лабиринта КМ-34 (2, 4 и 8 мг/кг, п/о) давали за 1 ч до скополамина (1 мг/кг, в/б). Данные выражены в виде среднего $\pm$ CO ($n = 7$, на группу) процента спонтанных изменений. Для статистического анализа проводили ANOVA и критерий множественных сравнений Тьюки. Разные буквы отличаются друг от друга с $p < 0,01$.



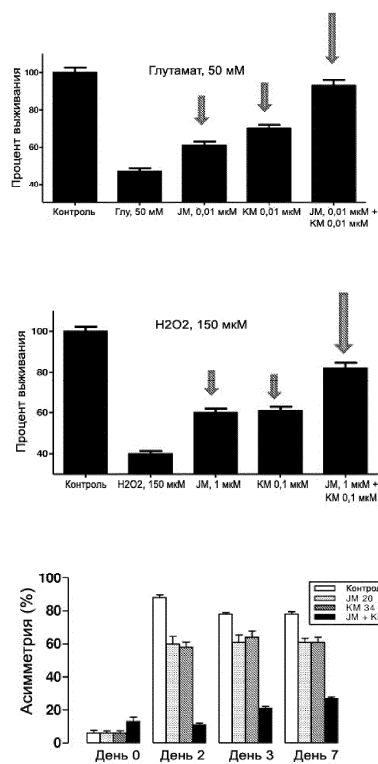
Фиг. 12

Действие КМ-34 на память, связанную с распознаванием новых объектов. В тесте на распознавание новых объектов КМ-34 (2, 4 и 8 мг/кг, п/о) вводили за 1 ч до скополамина (1 мг/кг, в/б) перед фазой обучения. Результаты выражены в виде уровня различия общего времени, затраченного на изучение объекта N по сравнению с F. Данные выражены в виде среднего $\pm$ CO (n = 8, на группу). Для статистического анализа проводили ANOVA и критерий множественных сравнений Тьюки. Разные буквы отличаются друг от друга с $p < 0,01$.



Фиг. 13

Однократная обработка КМ-34 снижала объем инфаркта, отек и поведенческий дефицит у крыс после 90 мин окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) и 23 ч реперфузии. Разные дозы соединения вводили перорально через 1 ч после реперфузии. (А) Типовые коронарные срезы головного мозга (толщина 2 мм) ложнопрооперированной и ишемической групп, обработанных базовым раствором или КМ-34 (0,1, 0,5 или 1 мг/кг), окрашенные 2,3,5-трифенилтетразолием (ТТХ), 2%. Красные области соответствуют неповрежденной ткани, а белые - ишемическим участкам. (В) Количественный анализ кортикальных, субкортикальных и общих поражений. (С) Нейрологический дефицит. Планки представляют среднее $\pm$ СПС (n = 8). Разные буквы на (А) и (В): $p < 0,05$, по ANOVA апостериорному критерию Ньюмана-Кейлса. Масштаб = 10 мм.



Фиг. 14

Действие JM-20, KM-34 и их комбинации на асимметрию, индуцированную термокоагуляцией кортикальных артерий.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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