

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 039617

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.02.17

(21) Номер заявки
202000011

(22) Дата подачи заявки
2018.06.07

(51) Int. Cl. C07D 213/16 (2006.01)
A61K 31/4425 (2006.01)
A61P 25/08 (2006.01)

(54) ПРОИЗВОДНОЕ ПИРИДОКСИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЭПИЛЕПСИИ

(31) 2017126301

(32) 2017.07.24

(33) RU

(43) 2020.04.30

(86) PCT/RU2018/000380

(87) WO 2019/022638 2019.01.31

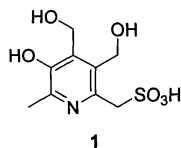
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
"ТАТХИМФАРМПРЕПАРАТЫ";
ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ "КАЗАНСКИЙ

(ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ" (RU)

(72) Изобретатель:
Штырлин Юрий Григорьевич,
Дзюркевич Михаил Станиславович,
Штырлин Никита Валерьевич,
Герасимова Елена Вячеславовна,
Иксанова Альфия Габдулахатовна,
Ситдикова Гузель Фаритовна,
Яковлев Алексей Валерьевич (RU)

(56) Mohammad Asif: "Rol of various vitamins in the patents with epilepsy", International Journal of Pharmacological Reserch, vol. 3, Issue 1, 2013, DOI: 10.7439/ijpr, p. 2.2-2.5, 3
WO-A1-2014085153

(57) Изобретение относится к химии органических гетероциклических соединений, а именно к новому соединению на основе пиридоксина формулы 1



Техническим результатом предлагаемого изобретения является новое противоэпилептическое соединение на основе пиридоксина, обладающее способностью эффективно купировать эпилептические припадки. В целом заявленное техническое решение позволяет создать новый высокоэффективный и безопасный лекарственный препарат для терапии эпилепсии, который потенциально позволит существенно повысить качество и продолжительность жизни пациентов.

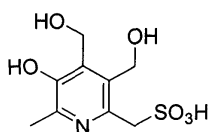
B1

039617

039617

B1

Изобретение относится к физиологически активным веществам - производным пиридоксина, а именно соединению формулы 1, обладающему противозепилептической активностью



1

Эпилепсия - одно из наиболее распространенных в мире хронических заболеваний нервной системы, которым страдают как дети, так и взрослые. По данным ВОЗ эпилепсией страдают около 50 млн человек, что составляет порядка 0,5-1% населения планеты. Ежегодно в мире диагностируется примерно 2,5 млн новых случаев. 30% больных эпилепсией являются фармакорезистентными.

Из исследованного уровня техники заявителем не выявлены технические решения - аналоги заявленного изобретения по химической структуре.

Из исследованного уровня техники заявителем выявлены известные технические решения - аналоги заявленного изобретения по назначению, а именно - противозепилептические препараты.

В соответствии с современной международной практикой все имеющиеся в настоящее время противозепилептические препараты (ПЭП) подразделяют на старые (фенобарбитал и дифенин); промежуточные (сукцинимиды и бензодиазепины); базовые (вальпроаты и карбамазепин); новые (ламотриджин, топирамат, окскарбазепин, леветирацетам, тиагабин, габапентин, фелбамат, прегабалин, зонисамид).

Из перечисленных выше препаратов препараты вальпроевой кислоты (вальпроаты) и препараты группы карбамазепина в настоящее время применяют наиболее часто и считают препаратами "первого выбора" (базовые препараты).

Известен препарат Депакин (Sanofi-Aventis, Франция). Активное вещество - вальпроевая кислота. Показания к применению: генерализованные эпилептические приступы - клонические, тонические, тонико-клонические, абсансы, миоклонические, атонические; синдром Леннокса-Гасто; парциальные эпилептические приступы с вторичной генерализацией или без нее (в монотерапии или в комбинации с другими противозепилептическими средствами). Допускается применение в педиатрии.

Недостатком известного препарата являются следующие побочные эффекты: сонливость, расстройства желудочно-кишечного тракта, гепатотоксичность, панкреотоксичность, тошнота, набор веса [Stevens G.M. Pharmacology / G.M. Stevens, C.W. Brenner. - Philadelphia: Elsevier/Sounders, 2013. - 519 с. (https://books.google.ru/books?id=Cd39SN6OBiMC&pg=PA204&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)].

Острая токсичность на мышах (вальпроат натрия) при пероральном введении LD₅₀: 977 мг/кг, при внутривентральном введении LD₅₀: 470 мг/кг (<http://datasheets.scbt.com/sc-202378.pdf>).

Известен препарат Финлепсин (AWD.pharma, Германия). Активное вещество - карбамазепин. Показания к применению: эпилепсия - парциальные припадки с элементарной симптоматикой (фокальные припадки), парциальные припадки со сложной симптоматикой, психомоторные припадки, большие судорожные припадки в основном фокального генеза (большие судорожные припадки во время сна, диффузные большие судорожные припадки), смешанные формы эпилепсии; невралгия тройничного нерва; идиопатическая невралгия языкоглоточного нерва; боли при диабетической полиневропатии; эпилептиформные судороги при рассеянном склерозе, спазмы лицевых мышц при невралгии тройничного нерва, тонические судороги, пароксизмальная дизартрия и атаксия, пароксизмальные парестезии и приступы боли; синдром алкогольной абстиненции (тревога, судороги, гипервозбудимость, нарушения сна); психотические расстройства (аффективные и шизоаффективные расстройства, психозы, нарушения функции лимбической системы). Допускается применение в педиатрии.

Недостатком известного препарата являются следующие побочные эффекты: сонливость, заторможенность и прочие признаки угнетения центральной нервной системы, атаксия, тошнота, редко апластическая анемия [Stevens G.M. Pharmacology / G.M. Stevens, C.W. Brenner. - Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2013. - 519 с. (https://books.google.ru/books?id=Cd39SN6OBiMC&pg=PA204&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)].

Острая токсичность на мышах (карбамазепин) при пероральном введении LD₅₀: 529 мг/кг, при внутривентральном введении LD₅₀: 114 мг/кг (<http://datasheets.scbt.com/sc-202518.pdf>).

Известен препарат Фенобарбитал (ОАО Дальхимфарм, Россия). Активное вещество - фенобарбитал. Показания к применению: эпилепсия - генерализованные тонико-клонические припадки, фокальные приступы у взрослых и детей; хорея; спастические параличи; различные судорожные реакции; в качестве успокаивающего в малых дозах в сочетании с другими препаратами (спазмолитики, сосудорасширяющие средства) при нейровегетативных расстройствах; как снотворное средство. Допускается применение в педиатрии.

Недостатком известного препарата являются следующие побочные эффекты: атаксия, снижение умственных способностей, сонливость, головокружение, развитие зависимости, сыпь, угнетение дыхания [Stevens G.M. Pharmacology / G.M. Stevens, C.W. Brenner. - Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2013. - 519 с. (https://books.google.ru/books?id=Cd39SN6OBiMC&pg=PA204&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)]. Острая токсичность на крысах (фенобарбитал) при пероральном введении LD₅₀: 163 мг/кг (<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9926461>).

Известен препарат Дифенин (Усолье-Сибирский ХФЗ, Россия). Активное вещество - фенитоин. Показания к применению: эпилепсия (большие судорожные припадки); эпилептический статус с тонико-клоническими припадками; эпилептические припадки в нейрохирургии (профилактика и лечение); желудочковые аритмии (в т.ч. при гликозидной интоксикации или связанные с интоксикацией трициклическими антидепрессантами); невралгия тройничного нерва (в качестве средства второго ряда или в комбинации с карбамазепином). Допускается применение в педиатрии.

Недостатком известного препарата являются следующие побочные эффекты: нарушения пищеварения, гиперплазия десен, мегалобластная анемия и прочие проявления недостаточности красных кровяных телец, остеомалиция, психиатрические проявления [Stevens G.M. Pharmacology / G.M. Stevens, C.W. Brenner. - Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2013. - 519 с. (https://books.google.ru/books?id=Cd39SN6OBiMC&pg=PA204&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)]. Острая токсичность на мышах (фенитоин натрия) при пероральном введении LD₅₀: 165 мг/кг (http://www.pfizer.com/system/files/products/material_safety_data/PHENYTOIN%20SODIUM%20SOLN.pdf).

Известен препарат Суксилеп (Delpharm Lille S.a.S., Франция). Активное вещество - этосуксимид. Показания к применению: приступы пикнолептических абсансов; сложные и атипичные судорожные припадки; миоклонико-астатические малые припадки; юношеские миоклонические припадки (импульсивные малые припадки). Не рекомендуется к применению для детей до 6 лет.

Недостатком известного препарата являются следующие побочные эффекты: сонливость, головокружение, нарушения пищеварения, вялость и тошнота [Stevens G.M. Pharmacology / G.M. Stevens, C.W. Brenner. - Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2013. - 519 с. (https://books.google.ru/books?id=Cd39SN6OBiMC&pg=PA204&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)]. Острая токсичность на мышах (этосуксимид) при пероральном введении LD₅₀: 1530 мг/кг (http://www.pfizer.com/files/products/material_safety_data/ETHOSUXIMIDE%20CAPSULES.pdf).

Известен препарат Ламитор (Torrent Pharmaceuticals, Индия). Активное вещество - ламотриджин. Показания к применению: эпилепсия - парциальные и генерализованные припадки, включая тонико-клонические судороги, а также припадки при синдроме Леннокса-Гасто в составе комбинированной терапии или монотерапии. Допускается применение в педиатрии.

Недостатком известного препарата являются следующие побочные эффекты: атаксия, диплопия, головокружение, сонливость, головная боль, тошнота, сыпь, синдром Стивенса-Джонсона [Stevens G.M. Pharmacology / G.M. Stevens, C.W. Brenner. - Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2013. - 519 с. (https://books.google.ru/books?id=Cd39SN6OBiMC&pg=PA204&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)]. Острая токсичность на мышах (ламотриджин) при пероральном введении LD₅₀: 269 мг/кг (<http://www.msds-gsk.com/GetSdsFile.ashx?fileId=5508>).

Известен препарат Топирамат (АЛСИ Фарма, Россия). Активное вещество - топирамат. Показания к применению: монотерапия у взрослых и детей с 6 лет с парциальными (с вторичной генерализацией или без) или первично генерализованными тонико-клоническими судорогами; комплексная терапия у взрослых и детей старше 3 лет с парциальными с вторичной генерализацией или без или генерализованными тонико-клоническими судорогами, а также для лечения судорог, обусловленных синдромом Леннокса-Гасто; профилактика приступов мигрени у взрослых.

Недостатком известного препарата являются следующие побочные эффекты: атаксия, головокружение, сонливость, нистагм, парестезия, психомоторные нарушения [Stevens G.M. Pharmacology / G.M. Stevens, C.W. Brenner. - Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2013. - 519 с. (https://books.google.ru/books?id=Cd39SN6OBiMC&pg=PA204&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)]. Острая токсичность на крысах (топирамат) при пероральном введении LD₅₀: 3570 мг/кг ([https://fragron.com/sites/default/files/document/msds_coa/97240-79-4_\(USA\).pdf](https://fragron.com/sites/default/files/document/msds_coa/97240-79-4_(USA).pdf)).

Известен препарат Леветинол (Actavis hf., Исландия). Активное вещество - леветирацетам. Показания к применению: парциальные судороги с вторичной генерализацией или без нее у пациентов с 16 лет с впервые диагностированной эпилепсией; миоклонические судороги у пациентов с ювенильной миоклонической эпилепсией с 12 лет; первично генерализованные тонико-клонические судороги у пациентов с идиопатической генерализованной эпилепсией с 12 лет.

Недостатком известного препарата являются следующие побочные эффекты: сонливость, слабость и головокружение [Stevens G.M. Pharmacology / G.M. Stevens, C.W. Brenner. - Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2013. - 519 с. (https://books.google.ru/books?id=Cd39SN6OBiMC&pg=PA204&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)]. Острая токсичность на мышах (леветирацетам) при пероральном введении LD₅₀: >5000 мг/кг

(<http://www.akorn.com/documents/catalog/msds/50383-241-16.pdf>), при внутривенном введении LD₅₀: 1081 мг/кг (<https://www.caymanchem.com/msdss/9001820m.pdf>).

Известен препарат Тебантин (Gedeon Richter, Венгрия). Активное вещество - габапентин. Показания к применению: парциальные судороги с вторичной генерализацией или без нее у взрослых и детей старше 12 лет в качестве монотерапии или дополнительной терапии; парциальные судороги с вторичной генерализацией или без нее у детей от 3 до 12 лет в качестве дополнительной терапии; нейропатические боли у больных старше 18 лет.

Недостатком известного препарата являются следующие побочные эффекты: атаксия, сонливость, головокружение, нистагм и дрожание конечностей [Stevens G.M. Pharmacology / G.M. Stevens, C.W. Brenner. - Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2013. - 519 с.

(https://books.google.ru/books?id=Cd39SN6OBiMC&pg=PA204&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false).

Острая токсичность на мышах (габапентин) при пероральном введении LD₅₀: >5000 мг/кг; при внутривенном введении LD₅₀: 1000-2000 мг/кг

(http://www.pfizer.com/system/files/products/material_safety_data/PZ01158.pdf).

Известен препарат Лирика (Pfizer Manufacturing Deutschland, Германия). Активное вещество - прегабалин. Показания к применению: нейропатическая боль у взрослых; эпилепсия (в качестве дополнительной терапии у взрослых с парциальными судорожными приступами, сопровождающимися или не сопровождающимися вторичной генерализацией); генерализованное тревожное расстройство у взрослых; фибромиалгия у взрослых. Не применяется в педиатрии.

Недостатком известного препарата являются следующие побочные эффекты: сонливость, нарушения зрения, набор веса, нарушение координации движений [Stevens G.M. Pharmacology / G.M. Stevens, C.W. Brenner. - Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2013. - 519 с.

(https://books.google.ru/books?id=Cd39SN6OBiMC&pg=PA204&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false).

Острая токсичность на крысах (габапентин) при пероральном введении LD₅₀: >5000 мг/кг; при внутривенном введении LD₅₀: > 300 мг/кг (http://www.pfizer.com/system/files/products/material_safety_data/PZ01158.pdf).

Известен препарат Зонегран (Eisai Co. Ltd., Япония). Активное вещество - зонисамид. Показания к применению: монотерапия у пациентов с парциальными эпилептическими приступами с вторичной генерализацией или без, с впервые диагностированной эпилепсией; в составе дополнительной терапии у взрослых, подростков и детей с 6 лет с парциальными эпилептическими приступами с вторичной генерализацией или без.

Недостатком известного препарата являются следующие побочные эффекты: головная боль, головокружение, сонливость, анорексия, тошнота, в раннем возрасте метаболический ацидоз [Stevens G.M. Pharmacology / G.M. Stevens, C.W. Brenner. - Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2013. - 519 с.

(https://books.google.ru/books?id=Cd39SN6OBiMC&pg=PA204&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false).

Острая токсичность на мышах (зонисамид) при пероральном введении LD₅₀: 1829 мг/кг, при внутрибрюшинном введении LD₅₀: 699 мг/кг (<http://datasheets.scbt.com/sc-203316.pdf>).

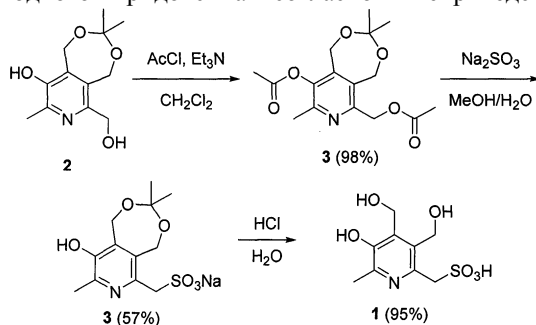
Таким образом, общими недостатками известных препаратов являются наличие существенных побочных эффектов, невосприимчивость симптомов болезни к лечению, а также высокая стоимость лечения. На сегодняшний день велика потребность в создании и внедрении в клиническую практику новых, эффективных и безопасных препаратов для лечения эпилепсии.

Задачей заявленного изобретения является получение нового соединения, обладающего высокой противозипилептической активностью и не имеющего аналогов в мире по химической структуре.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является новое противозипилептическое соединение на основе пиридоксина, обладающее способностью эффективно купировать эпилептические припадки.

Задача решается и указанный технический результат достигается получением заявленного нового соединения формулы 1, обладающего способностью эффективно снижать эпилептическую активность мозга.

Заявленное соединение получают посредством трехстадийного синтеза из исходного 6-гидроксиметильного производного пиридоксина 2 согласно нижеприведенной схеме



Структуры полученных соединений подтверждены методами масс-спектрометрии, ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии. Спектры ЯМР регистрируют на приборе Bruker AVANCE-400. Химический сдвиг определяют относительно сигналов остаточных протонов дейтерированных растворителей (^1H и ^{13}C). Температуры плавления определяют с помощью прибора Stanford Research Systems MPA-100 OptiMelt. Контроль за ходом реакций и чистотой соединений проводят методом ТСХ на пластинах Sorbfil Plates. Эксперимент ВЭЖХ/МС сверхвысокого разрешения проведен с использованием масс-спектрометра TripleTOF 5600, AB Sciex (Германия).

В качестве препаратов, вызывающих эпилептические припадки, брали пенициллин и коразол, которые, как известно из уровня техники, способны вызывать эпилептические припадки при попадании в центральную нервную систему [Миронов А.К, Бунатян Н.Д. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств].

Заявленное изобретение иллюстрируется фиг. 1 и 2.

На фиг. 1 представлена таблица, в которой приведены данные по противозипилептическим свойствам соединения 1 на пенициллиновой модели эпилепсии на крысах.

На фиг. 2 представлена таблица, в которой приведены данные по противозипилептическим свойствам соединения 1 на коразоловой модели эпилепсии на крысах.

Заявленное изобретение поясняется следующими примерами конкретного выполнения.

Пример 1. Синтез (5-гидрокси-3,4-бис(гидроксиметил)-6-метилпиридин-2-ил)метансульфонокислоты (1).

Соединение 1 получают в 3 стадии из исходного соединения (2).

1 стадия. Навеску 100,0 г (0,418 моль) 6-(гидроксиметил)-3,3,8-триметил-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридин-9-ола (2) [Штырлин, Н.В. Новый метод синтеза 6-метил-2,3,4-трис(гидроксиметил)пиридин-5-ола / Н.В. Штырлин, А.Д. Стрельник, Л.П. Сысоева, О.А. Лодочкикова, Е.Н. Климовицкий, Ю.Г. Штырлин // Журн. орг. химии. - 2009. - Т. 45, вып. 8. - С. 1274-1275.] суспендируют в 1000 мл дихлорметана. К полученной суспензии при перемешивании одной порцией добавляют 145,0 мл (1,045 моль) триэтиламина, затем по каплям 74,2 мл (1,045 моль) ацетилхлорида. Реакционную смесь перемешивают 2 ч при комнатной температуре. После этого раствор промывают три раза по 500 мл воды. Органическую фракцию сушат над сульфатом магния, профильтровывают и упаривают на ротаторном испарителе с получением 132,0 г (98%) (9-ацетокси-3,3,8-триметил-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридин-6-ил)метилацетата (3).

2 стадия. Навеску (9-ацетокси-3,3,8-триметил-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридин-6-ил)метилацетата (3) из предыдущей стадии (132,0 г, 0,408 моль) растворяют в 700 мл метилового спирта. Отдельно готовят раствор 127,0 г (1,225 моль) сульфата натрия в 900 мл воды. Полученные растворы сливают вместе и перемешивают при комнатной температуре в течение 4 ч. После чего смесь нейтрализуют соляной кислотой до pH 7.0 и упаривают на ротаторном испарителе. Сухой кубовый остаток экстрагируют 600 мл горячего n-пропилового спирта и фильтруют. Из фильтрата при охлаждении выпадает продукт, который отфильтровывают, промывают 3 раза по 50 мл холодным n-пропанолом и сушат с получением 75,9 г (57%) (9-гидрокси-3,3,8-триметил-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридин-6-ил)метансульфоната (4) натрия. Т.пл. 197°C с разл. ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6), δ , м.д.: 1,38 (с, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 2,30 (с, 3H, CH_3); 3,82 (с, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$); 4,79 (с, 2H, CH_2); 4,90 (с, 2H, CH_2). ЯМР ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (100 МГц, DMSO-d_6), δ , м.д.: 19,28; 23,73; 57,47; 59,11; 60,97; 101,45; 132,07; 134,18; 140,97; 143,25; 146,78. HRMS-ESI: найдено $[\text{M}+\text{H}]^+$ 326,0669, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 348,0488, $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NNaO}_6\text{S}$, вычислено $[\text{M}+\text{H}]^+$ 326,0669, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 348,0488.

3 стадия. Навеску (9-гидрокси-3,3,8-триметил-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридин-6-ил)метансульфоната (4) натрия из предыдущей стадии (75,9 г, 0,233 моль) растворяют в 500 мл воды. Полученный раствор доводят до pH 1 концентрированной соляной кислотой. Реакционную смесь оставляют на 3 ч при комнатной температуре, после чего упаривают на ротаторном испарителе. Сухой остаток экстрагируют 200 мл холодной соляной кислоты и отфильтровывают. К фильтрату добавляют 700 мл изопропанола. Из смеси на холоде выпадает кристаллический осадок, который отфильтровывают и промывают 3 раза по 30 мл холодным изопропанолом и сушат с получением целевого продукта – 60,8 г (95%) (5-гидрокси-3,4-бис(гидроксиметил)-6-метилпиридин-2-ил)метансульфонокислоты (1). Т. разл. 250°C. ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6), δ , м.д.: 2,56 (с, 3H, CH_3); 4,27 (с, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$); 4,70 (с, 2H, CH_2); 4,90 (с, 2H, CH_2). ЯМР ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (100 МГц, DMSO-d_6), δ , м.д.: 14,74; 51,57; 55,52; 56,19; 136,44; 138,79; 141,50; 142,95; 151,62. HRMS-ESI: найдено $[\text{M}+\text{H}]^+$ 264,0536, $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_6\text{S}$, вычислено $[\text{M}+\text{H}]^+$ 264,0536.

Пример 2. Исследование влияния соединения 1 на электрическую активность мозга при эпилептических приступах (на примере пенициллиновой модели эпилепсии).

Эксперименты проводили на самцах крыс линии Вистар массой тела 180-250 г.

Под изофлурановым наркозом (1,5%) проводят операционную подготовку к эксперименту. Для анестезии на время эксперимента используют уретан (1,5 мг/кг). Далее фиксируют животное в стереотаксической установке. В черепе животных просверливают отверстия 2×2 мм над симметричными областями сенсомоторной коры головного мозга и устанавливают 16-канальный зонд на кремниевой основе (Neuropexus) с шагом 100 мкм между регистрирующими электродами для отведения электрической активно-

сти с указанных областей. Хлорсеребряный электрод, который служит объединенным заземленным электродом сравнения, вводят в мозжечок или зрительную кору на глубину 2-3 мм.

Для создания очага эпилептической активности параллельно соматосенсорным зонам в области зрительной коры просверливают отверстия 2×2 мм, куда апплицируют 10 мкл раствора натриевой соли бензилпенициллина в концентрации 40000 МЕ/мл.

Соединение 1 в дозе 100, 50, 25 мг/кг вводят внутрибрюшинно (в/б) на фоне устойчивой эпилептиформной активности через 30 мин после аппликации пенициллина. Оценивают амплитудно-частотные характеристики эпилептиформной активности.

В качестве вещества сравнения используют вальпроат натрия 600 мг/кг, который вводят в/б на фоне устойчивой эпилептиформной активности.

При статистической обработке экспериментальных данных используют статистические программы Origin 8.5 и IBM SPSS Statistics.

Достоверность различий между популяциями оценивают по U-критерию Манна-Уитни.

Результаты экспериментов заявителя по примеру 2 показывают следующее.

Через 2-3 мин после внутричерепной аппликации пенициллина наблюдают появление на электроэнцефалограмме острых высокоамплитудных волн (1000-20000 мкВ) с частотой от 20 до 70 мин⁻¹. Высокоамплитудные электрические разряды (ВЭР), вызываемые пенициллином, наблюдают на протяжении 3 ч регистрации. Их наличие, частота и амплитуда являются характеристическими показателями эпилептической активности головного мозга.

Эффект пенициллина через 30 мин действия приравнен к 100% и назван "точкой отсчета", начиная с которой вводят исследуемые соединения (заявленное соединение и препарат сравнения - вальпроат натрия).

Характеристики ВЭР через 5, 30 и 60 мин после точки отсчета приведены на фиг. 1.

Из данных фиг. 1 видно, что введение заявленного соединения 1 приводит к снижению амплитуды и частоты ВЭР, полностью подавляя ВЭР у животного через 60 мин после введения.

Введение вальпроата натрия не приводит к полному подавлению ВЭР. Из вышеизложенного можно сделать вывод, что противозипилептический эффект заявленного соединения 1 в дозе 25, 50, 100 мг/кг выражен значительно сильнее, чем у препарата сравнения - вальпроата натрия, так как введение вальпроата натрия даже в дозе 600 мг/кг не приводит к полному подавлению ВЭР. Таким образом, противозипилептический эффект заявленного соединения выше по сравнению с вальпроатом натрия не менее чем в 6-24 раза.

Пример 3. Исследование влияния соединения 1 на развитие судорог (на примере коразоловой модели эпилепсии).

Эксперименты проводили на самцах крыс линии Вистар массой тела 180-250 г.

Коразол в дозе 80 мг/кг вводят подкожно в область шейного отдела спины. Животные наблюдались в течение 60 мин после инъекции коразола с регистрацией основного показателя - первых генерализованных клонических судорог с утратой рефлекса переворачивания.

Интенсивность развития судорожного приступа изучали по 6-балльной шкале, где

0 - отсутствие судорожной активности;

1 - гиперкинезия;

2 - дрожание, подёргивание, чрезмерный груминг, стереотипные движения;

3 - клонические судороги передних лап с подъёмом на задние лапы;

4 - выраженные тонико-клонические судороги, падение животного набок, наличие фазы тонической экстензии;

5 - повторные тонико-клонические судороги, утрата позы;

6 - полный тонический приступ с апноэ, гибель животного.

Для исследования влияния заявленного соединения 1 на развитие судорог, вызванных коразолом, соединение 1 растворяют в физиологическом растворе и вводят следующим образом:

в дозах 25, 100 мг/кг внутрибрюшинно (в/б) за 30 мин до индукции судорог коразолом;

в дозах 100, 200, 250 мг/кг внутривенно за 1 ч до индукции судорог коразолом.

Развитие судорожного синдрома оценивают по следующим показателям:

время до начала судорог, мин;

продолжительность судорог, с;

интенсивность судорог по 6-балльной шкале;

число животных с повторными судорогами;

число погибших животных в группе.

При статистической обработке экспериментальных данных используют статистические программы Origin 8.5 и IBM SPSS Statistics.

Достоверность различий между популяциями оценивают по U-критерию Манна-Уитни.

Результаты исследования влияния соединения 1 на развитие судорог, вызванных коразолом, приведены на фиг. 2.

Как видно из данных, приведенных на фиг. 2, результаты эксперимента по примеру 3 показывают выраженную противозипилептическую активность соединения 1 на коразоловой модели эпилепсии на

крысах как при пероральном, так и в/б путях введения, которая выражается в дозозависимом снижении продолжительности и интенсивности судорог.

Кроме того, во всех дозировках соединение 1 сильно снижает вероятность возникновения повторных судорог, а также полностью предотвращает летальные исходы.

Наилучшие результаты по уменьшению развития судорожного приступа после введения коразола наблюдают при пероральном введении соединения 1 в дозе 250 мг/кг. В концентрациях 100 и 200 мг/кг эффект заявленного соединения 1 выражен несколько меньше.

Пример 4. Определение острой токсичности на мышах при пероральном введении.

Исследование проводили на мышах линии CD-1 (ICR) (6-8 недель, вес не менее 18 г, самки). Используют двукратное внутрижелудочное (пероральное) введение соединения 1 в объеме не более 0,5 мл/30 г живой массы тела мыши с применением желудочного зонда.

Введение осуществляют животным, лишенным корма (на промежуток времени не менее 8 ч) со свободным доступом к воде. Объем введения рассчитывают индивидуально для каждого животного, основываясь на массе тела, зарегистрированной непосредственно перед введением вещества. Доступ к воде и корму возобновляют через час после введения.

Для приготовления дозы 5000 мг/кг для введения мышам взвешивают навеску 1,5 г соединения 1 в полистироловой лодочке на весах Vibra (Shinko Denshi, Япония), переносят в мерную колбу класса точности А на 10 мл объема, растворяют в дистиллированной воде и доводят до метки. По причине недостаточной растворимости соединения 1 к полученному объему раствора добавляют еще 10 мл дистиллированной воды.

Клинический осмотр животных проводят индивидуально после введения на протяжении 30 мин, затем не реже одного раза в час на протяжении 4 ч, далее ежедневно один раз в день в течение 14 дней. Массу тела регистрируют непосредственно перед введением препарата для расчета объема введения, далее один раз в 2 дня.

На основании проведенных исследований обнаружено, что соединение 1 является малотоксичным, поскольку параметр LD_{50} при пероральном применении у крыс превышает 5000 мг/кг массы тела.

Пример 5. Определение острой токсичности на мышах при внутрибрюшинном введении.

Исследование проводили на мышах линии CD-1 (ICR) (6-8 недель, вес не менее 18 г) обоего пола. Использовали однократное внутрибрюшинное введение соединения 1 в дозах 1000 и 2000 мг/кг в объеме 1 мл на 40 г массы тела мыши с применением инсулинового шприца. Объем введения рассчитывали индивидуально для каждого животного, основываясь на массе тела, зарегистрированной непосредственно перед введением вещества.

Для приготовления дозы 2000 мг/кг для введения мышам взвешивают навеску 800 мг соединения 1 в полистироловой лодочке на весах Vibra (Shinko Denshi, Япония), переносят в мерную колбу класса точности А на 10 мл объема, растворяют в физиологическом растворе и доводят до метки. Раствор фильтруют шприцевыми насадками с размером пор 0,22 мкм (Jet Biofil).

Для приготовления дозы 1000 мг/кг для введения мышам взвешивают навеску 400 мг соединения 1 в полистироловой лодочке на весах Vibra (Shinko Denshi, Япония), переносят в мерную колбу класса точности А на 10 мл объема, растворяют в физиологическом растворе и доводят до метки. Раствор фильтруют шприцевыми насадками с размером пор 0,22 мкм (Jet Biofil).

Клинический осмотр животных проводят индивидуально после введения на протяжении 30 мин, затем не реже раза в час на протяжении 4 ч, далее ежедневно один раз в день в течение 14 дней. Массу тела регистрируют непосредственно перед введением препарата для расчета объема введения далее один раз в 2 дня.

На основании проведенных исследований обнаружено, что соединение 1 является малотоксичным, поскольку параметр LD_{50} при внутрибрюшинном введении у крыс превышает 2000 мг/кг массы тела.

Таким образом, из вышеизложенного можно сделать вывод, что заявленное соединение проявляет высокий уровень противоэпилептической активности.

Так, в дозах 25, 50 и 100 мг/кг соединение 1 полностью подавляет эпилептическую электрическую активность мозга в течение часа после внутрибрюшинного введения крысам на пенициллиновой модели эпилепсии.

На коразоловой модели эпилепсии на крысах показано снижение интенсивности и продолжительности судорог при введении соединения 1 в дозах 25 и 100 мг/кг внутрибрюшинно и 100 и 200 мг/кг перорально, а также полное предотвращение развития судорог в отдельных случаях при дозировке 250 мг/кг при пероральном введении.

При этом соединение 1 является малотоксичным, поскольку параметр LD_{50} у крыс превышает 2000 и 5000 мг/кг массы тела при внутрибрюшинном и пероральном введении соответственно.

В целом можно констатировать, что заявителем выполнены поставленные задачи и достигнут заявленный технический результат, а именно получено новое соединение, обладающее высокой противоэпилептической активностью и не имеющее аналогов в мире по химической структуре. Полученный препарат потенциально позволит существенно повысить качество и продолжительность жизни пациентов.

Заявленное изобретение соответствует критерию "новизна", предъявляемому к изобретениям, так

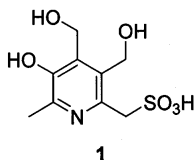
как из исследованного уровня техники не выявлены технические решения, обладающие заявленной совокупностью отличительных признаков, обеспечивающих достижение заявленных результатов.

Заявленное изобретение соответствует критерию "изобретательский уровень", предъявляемому к изобретениям, так как не является очевидным для специалиста в данной области науки и техники.

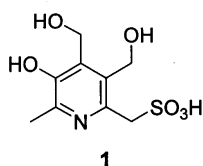
Заявленное изобретение соответствует критерию "промышленная применимость", т.к. может быть реализовано на любом специализированном предприятии с использованием стандартного оборудования, известных отечественных материалов и технологий.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы 1



2. Применение соединения формулы 1



в качестве противоэпилептического средства.

Противоэпилептические свойства соединения 1 на пенициллиновой модели эпилепсии на крысах

Время от «точки отсчета», минуты	Пенициллин без лечения (n = 5)	Вальпроат натрия 600 мг/кг (n = 4)	1, 25 мг/кг (n = 2)	1, 50 мг/кг (n = 3)	1, 100 мг/кг (n = 2)
	Характеристика ВЭР (амплитуда, % / частота, %)				
5	121±6 / 94±12	100±8 / 47±51	68±3 / 79±9	98±27 / 101±4	95±1 / 106±14
30	85±11 / 92±17	81±9 / 67±22	49±2 / 66±20	39±10 / 44±8	87±2 / 73±33
60	69±13 / 31±44	60±14 / 58±34	ВЭР не наблюдаются	ВЭР не наблюдаются	ВЭР не наблюдаются

Фиг. 1

Противоэпилептические свойства соединения 1 на коразоловой модели эпилепсии на крысах

Характеристика судорог	Дозировка соединения 1					
	Контроль (n = 6)	25 мг/кг в/б (n = 4)	100 мг/кг в/б (n = 5)	100 мг/кг перорально (n = 3)	200 мг/кг перорально (n = 4)	250 мг/кг перорально (n = 4)*
Время до начала судорог, мин	13,5±5,4	11,8±2,6	16,3±2,7	10,2±2,2	10,5±1,5	7,2±1,1
Продолжительность судорог, с	38,6±2,2	24,6±3,6	26,4±4,8	21,5±0,5	19,7±4,3	12,5±1,2
Интенсивность судорог, баллы	5,1±0,3	4,5±0,2	4,0	4,5±0,5	3,8±0,3	3,0±0,5
Число животных с повторными судорогами	5	1	0	1	0	0
Число погибших животных	2	0	0	0	0	0

* В дозировке 250 мг/кг соединения 1 судороги развились только у двух животных из четырех.

Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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