

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 040399

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.05.27

(21) Номер заявки
201992397

(22) Дата подачи заявки
2018.05.11

(51) Int. Cl. C07D 413/12 (2006.01)
A61K 31/422 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(54) СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЭПИЛЕПСИИ, НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ И ДРУГИХ НАРУШЕНИЙ ЦНС

(31) 17170674.0

(32) 2017.05.11

(33) EP

(43) 2020.03.31

(86) PCT/EP2018/062199

(87) WO 2018/206760 2018.11.15

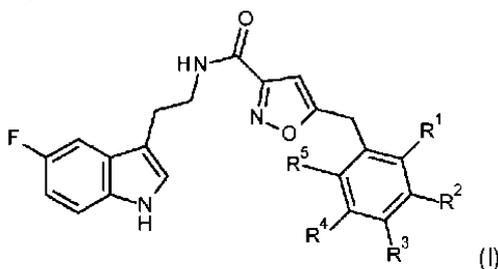
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
РЕМИНД Н.В; КАТОЛИКЕ
УНИВЕРСИТЕТ ЛЕВЕН (BE)

(56) WO-A1-2010142801

(72) Изобретатель:
Гриффиоен Йохан Джерард, Принсен
Катрин, Ван Доорен Том Франсуа Л.,
Маршан Арно Дидье Мари, Килонда
Амури, Алласиа Сара, Шалтин
Патрик (BE)

(74) Представитель:
Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Глухарёва А.О. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к соединению формулы (I) или его таутомеру, где R¹, R², R³, R⁴ и R⁵ имеют значение, определенное в формуле изобретения и описании. Настоящее изобретение также относится к композициям, в частности фармацевтическим композициям, содержащим такие соединения, и к применению таких соединений и композиций для профилактики и/или лечения эпилепсии и/или нейродегенеративных заболеваний.



040399 B1

040399 B1

Область изобретения

Данное изобретение относится к новым соединениям и к новым соединениям для применения в качестве лекарственного средства для профилактики или лечения эпилепсии, нейродегенеративных нарушений и других нарушений ЦНС. Данное изобретение также относится к применению указанных соединений для изготовления лекарственных средств, полезных для лечения эпилепсии. Данное изобретение также относится к способам получения указанных новых соединений.

Уровень техники

Эпилепсия представляет собой неврологическое нарушение, при котором страдающие пациенты предрасположены к возникновению эпилептических приступов, которые могут варьироваться от неконтролируемого подергивания до слабовыраженной кратковременной потери сознания. Эпилепсия имеет распространенность около 1% и не зависит от социально-экономического статуса, возраста или пола. Основные причины эпилепсии (эпилептогенеза) различны и включают как генетические, так и не генетические факторы риска (такие как инсульт или инфекция).

Один механизм, лежащий в основе данного расстройства, включает повышенную активность потенциалзависимых кальциевых каналов (VGCC), что приводит к усилению высвобождения нейротрансмиттеров, дисомеостаза Ca^{2+} и гиперактивности нейронов, которые могут лежать в основе, по меньшей мере, частично эпилептических приступов, ТАУ-фосфорилирования и последующей дегенерации нейронов и гибели нейронов.

ТАУ является внутриклеточным белком, способным связывать и, следовательно, стабилизировать и определять структуру и функцию микротрубочек. Помимо данной физиологической функции ТАУ также играет непосредственную роль при расстройствах, характеризующихся нерастворимыми агрегатами или полимерами tau, которые образуются при самополимеризации мономеров tau. Точные молекулярные механизмы, участвующие в агрегации ТАУ, неизвестны, но, по-видимому, включают (частичную) денатурацию или нарушение формирования третичной структуры белка ТАУ в конформациях с высокой склонностью к самоорганизации в структуры более высокого порядка.

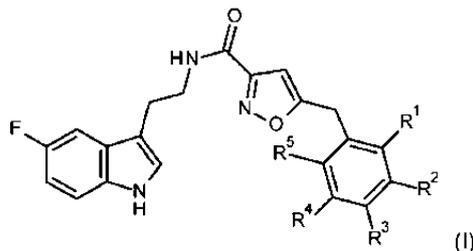
Важным аспектом агрегации ТАУ является присущая ему цитотоксичность, которая снижает целостность клеток или даже инициирует гибель клеток. Одним из важных аспектов токсической агрегации ТАУ при заболевании является гиперфосфорилирование некоторых аминокислотных остатков ТАУ белка. Гиперфосфорилирование ТАУ, по-видимому, облегчает процесс цитотоксической агрегации. Некоторые из киназ, прямо или косвенно участвующих в гиперфосфорилировании ТАУ, представляют собой митоген-активируемые киназы ERK1 и/или ERK2. Внутриклеточный Ca^{2+} является важным триггером для активации активности ERK1 и/или ERK2, и, таким образом, Ca^{2+} может усиливать токсическую агрегацию ТАУ.

Несмотря на то, что в настоящее время существует множество вариантов лечения эпилепсии, около 30% пациентов не поддаются лечению, что свидетельствует о существовании большой медицинской необходимости. Кроме того, существующие АЕД (противоэпилептические средства) имеют побочные эффекты, такие как нарушение когнитивных функций, которое оказывает большое негативное влияние на качество жизни пациентов, подвергающихся лечению. Наконец, современные способы лечения являются просто симптоматическими и не задерживают или не останавливают эпилептогенез или дегенерацию нейронов после первичного инсульта.

Таким образом, в данной области техники существует потребность в разработке улучшенных, более сильнодействующих лекарственных средств для терапевтического лечения, которые нацелены на основные молекулярные механизмы эпилепсии, в конкретных способах лечения, которые снижают гиперактивность нейронов с нейропротекторными свойствами и/или без ухудшения когнитивных функций.

Сущность изобретения

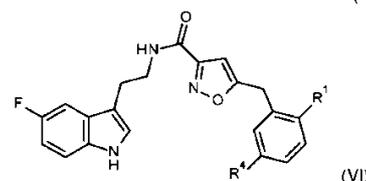
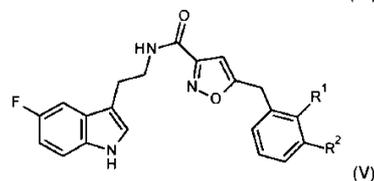
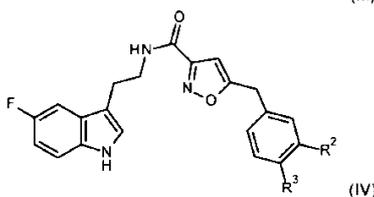
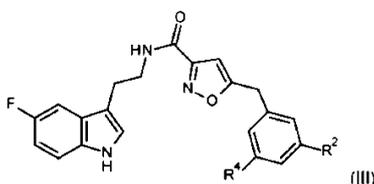
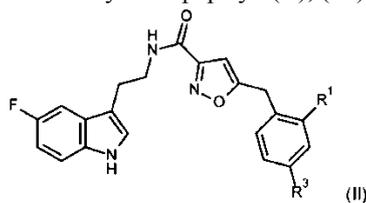
В первом аспекте данного изобретения предлагается соединение формулы (I) или его таутомер,



где

R^1 выбран из группы, состоящей из водорода и F; R^2 выбран из группы, состоящей из водорода и F; R^3 выбран из группы, состоящей из водорода и F; R^4 выбран из группы, состоящей из водорода и F; R^5 выбран из группы, состоящей из водорода и F; при условии, что по меньшей мере один из R^1 , R^2 , R^3 , R^4 или R^5 не является водородом; при условии, что указанное соединение формулы (I) не является N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]-5-[(3-фторфенил)метил]изоксазол-3-карбоксамидом, или фармацевтически приемлемая соль.

В другом аспекте соединение имеет любую из формул (II), (III), (IV), (V) или (VI):



где R^1 , R^2 , R^3 и R^4 имеют такие же значения, как определено в п. 1.

В другом аспекте R^2 , R^3 , R^4 и R^5 представляют собой водород, причем R^1 представляет собой F.

В другом аспекте R^1 , R^2 , R^4 и R^5 представляют собой водород и R^3 представляет собой F.

В другом аспекте R^2 , R^4 и R^5 представляют собой водород и R^1 и R^3 независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и F.

В другом аспекте R^1 , R^4 и R^5 представляют собой водород и R^2 и R^3 независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и F.

В другом аспекте R^1 , R^3 и R^5 представляют собой водород и R^2 и R^4 независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и F.

В другом аспекте R^3 , R^4 и R^5 представляют собой водород и R^1 и R^2 независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и F.

В другом аспекте R^2 , R^3 , и R^5 представляют собой водород и R^1 и R^4 независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и F.

В другом аспекте соединение выбрано из группы, состоящей из

5-[(2,4-дифторфенил)метил]-N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]изоксазол-3-карбоксамида;

N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]-5-[(4-фторфенил)метил]изоксазол-3-карбоксамида;

5-[(2,3-дифторфенил)метил]-N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]изоксазол-3-карбоксамида;

5-[(2,5-дифторфенил)метил]-N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]изоксазол-3-карбоксамида;

N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]-5-[(2-фторфенил)метил]изоксазол-3-карбоксамида;

5-[(3,4-дифторфенил)метил]-N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]изоксазол-3-карбоксамида;

5-[(3,5-дифторфенил)метил]-N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]изоксазол-3-карбоксамида.

В другом аспекте предлагается фармацевтическая композиция, содержащая одно или более фармацевтических вспомогательных соединений и терапевтически эффективное количество соединения по любому из пп. 1-10 и его фармацевтически приемлемой соли. В другом аспекте предлагается применение соединения или фармацевтической композиции в качестве лекарственного средства.

В другом аспекте предлагается применение соединения или фармацевтической композиции в качестве лекарственного средства для профилактики и/или лечения эпилепсии, нейродегенеративных расстройств, болевых расстройств, тревожных расстройств, депрессии, биполярного расстройства, психоза, синдрома отмены лекарственного средства, табака, потери памяти, деменции, шизофрении и паники.

В другом аспекте эпилепсия выбрана из группы, состоящей из рефрактерной эпилепсии, синдрома

Веста, синдрома Доуса, доброкачественной роландической эпилепсии, синдрома Расмуссена, синдрома Леннокса-Гасто, синдрома Стердж-Вебера, ювенильной миоклонической эпилепсии, абсансной эпилепсии у детей, эпилепсии, связанной с идиопатической локализацией, эпилепсии височной доли, парциальных судорог, простых парциальных судорог, тонических судорог, тонико-клонических судорог, клонических судорог, миоклонических судорог, абсансных судорог и атонических судорог, эпилепсии лобной доли, эпилепсии с большими эпилептическими припадками, генерализованной эпилепсии, идиопатической эпилепсии, симптоматической эпилепсии и криптогенной эпилепсии.

В другом аспекте нейродегенеративное расстройство выбрано из группы, состоящей из болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, диффузной болезни телец Леви, бокового амиотрофического склероза, болезни Ниманна-Пика, синдрома Халлервордена-Шпатца, синдрома Дауна, нейроаксональной дистрофии, множественной системной атрофии, болезни Хантингтона, лобно-височной лобарной дегенерации (FTLD), цистического фиброза и болезни Крейтцфельда-Якоба.

Далее данное изобретение будет дополнительно описано. В следующих частях более подробно определены различные аспекты данного изобретения. Каждый определенный таким образом аспект может быть объединен с любым другим аспектом или аспектами, если явно не указано иное. В частности, любой признак, указанный как предпочтительный или выгодный, может быть объединен с любым другим признаком или признаками, указанными как предпочтительный или выгодный.

В независимых и зависимых пунктах формулы изобретения изложены конкретные и предпочтительные признаки данного изобретения. Признаки зависимых пунктов формулы изобретения могут быть объединены с признаками независимых или других зависимых пунктов формулы изобретения, в зависимости от ситуации.

Краткое описание графических материалов

Последующее описание графических материалов конкретных вариантов реализации данного изобретения является просто примерным по своей природе и не предназначено для ограничения данных утверждений, их применения или использования.

На фиг. 1 в части А представлен график, демонстрирующий процентное содержание ЛДГ, проникшей в среду, каждой из клеток M17-TAU P301L (P301L TAU) и клеток M17-3.1 (вектор) в присутствии и отсутствии полностью транс-ретиноевой кислоты (RA). В части В представлен график, демонстрирующий относительные уровни цитозольного кальция в клетках M17-TAU P301L в присутствии и отсутствии ретиноевой кислоты (RA). **** указывают $p < 0,0001$.

На фиг. 2 представлен график, демонстрирующий процент активности ЛДГ, проникшей в среду, клеток M17-TAU P301L в присутствии RA, в зависимости от концентрации исрадипина, добавленного к клеткам.

На фиг. 3 представлен график, демонстрирующий относительные уровни цитозольного кальция в клетках M17-TAU P301L после воздействия ретиноевой кислотой в присутствии носителя или примерного соединения 6 при 625 нМ. *** указывают $p < 0,001$.

На фиг. 4 представлен график, демонстрирующий относительное количество жизнеспособных первичных нейронов после взаимодействия с диффундирующими лигандами, происходящими из амилоида (ADDL), в присутствии носителя или примерного соединения 6. * указывает $p < 0,05$ и ** указывает $p < 0,01$.

На фиг. 5 представлен график, демонстрирующий уровни цитозольного Ca^{2+} в первичных нейронах после деполяризации с помощью 45 мМ KCl в присутствии носителя или примерного соединения 6. **** указывают $p < 0,0001$.

На фиг. 6 представлены графики, демонстрирующие количественную оценку патологических фосфорилированных видов TAU, определенных вестерн-блоттингом экстрактов головного мозга трансгенных мышей APP, обработанных носителем или примерным соединением 6. На графиках демонстрируются средние нормированные сигналы $TAU \pm SEM$. ** указывают $p < 0,01$ относительно животных, получавших носитель. Сигналы TAU были получены с использованием антител к: (А) AT8 p-TAU, указывает на антитело, распознающее p-TAU, фосфорилированный по серину 202 и треонину 205; (В) AD2 p-TAU указывает на антитело, распознающее p-TAU, фосфорилированный по серинам 396 и 404; (С) TAU фосфорилированный по T231; (D) TAU фосфорилированный по S262.

На фиг. 7 продемонстрирован результат теста водного лабиринта Морриса на трансгенных мышях APP, получавших примерное соединение 6. (А) демонстрирует длину пути поиска во время фазы обучения. Значение Р относится к трансгенным мышам APP, получавшим примерное соединение 6 в сравнении с носителем. В части В продемонстрирован индекс пересечения кольца (относительная частота пересечения области воображаемой платформы) из тестового испытания. ** указывает $p < 0,01$.

На фиг. 8 представлен график, демонстрирующий частоту испускания импульсов нейрона мышей дикого типа и tgAPP как функцию электростимуляции (интенсивность шага (pA)) для примерного соединения 6. * и **** указывают $p < 0,05$ и $p < 0,0001$ соответственно дикого типа по сравнению с трансгенными мышами APP. # указывает $p < 0,05$ трансгенных мышей APP, получавших носитель, по сравнению с соединением 6.

На фиг. 9 представлен график, демонстрирующий амплитуды послегиперполяризационных (АНР) потенциалов одиночного действия с помощью фиксированных записей соматического тока с использо-

ванием срезов мозга мыши, инкубированных с носителем или с соединением 6. * указывает $p < 0,05$.

Подробное описание сущности изобретения

Перед описанием данного изобретения следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными описанными процессами, способами и соединениями, поскольку такие процессы, способы и соединения, конечно, могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология не предназначена для ограничения, поскольку объем данного изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

При описании соединений и способов по данному изобретению используемые термины следует истолковывать в соответствии со следующими определениями, если контекст не требует иного.

Как используется в описании и прилагаемой формуле изобретения, формы в единственном числе включают ссылки как единственного, так и множественного числа, если контекст явно не предписывает иное. Например, "соединение" означает одно соединение или более чем одно соединение.

Термины "содержащий", "содержит" и "состоящий из", в контексте данного документа, являются синонимами "включающий", "включает" или "содержащий", "содержит" и являются включающими или открытыми, и не исключают дополнительные, не приведенные члены, элементы или стадии способа. Термины "содержащий", "содержит" и "состоящий из" также включают термин "состоящий из".

Термин "около" в контексте данного документа, когда он относится к измеримому значению, такому как параметр, величина, временная длительность и тому подобное, предназначен для охвата вариаций $\pm 10\%$ или менее, предпочтительно $\pm 5\%$ или менее, более предпочтительно $\pm 1\%$ или менее и еще более предпочтительно $\pm 0.1\%$ или менее от указанного значения, если такие изменения подходят для раскрытого изобретения. Следует понимать, что значение, к которому относится модификатор "около", также конкретно и предпочтительно раскрыто.

Термин "и/или", в контексте данного документа, при использовании в списке из двух или более признаков означает, что любой из перечисленных признаков может использоваться сам по себе или может использоваться любая комбинация из двух или более перечисленных признаков. Например, если список описывается как содержащий группы А, В и/или С, то список может содержать только А; только В; только С; в сочетании А и В; в сочетании А и С, в сочетании В и С; или в сочетании А, В и С.

Перечисление числовых диапазонов по конечным точкам включает все целые числа и, при необходимости, дроби, отнесенные к этому диапазону (например, от 1 до 5, могут включать 1, 2, 3, 4, когда речь идет, например, о ряде элементов, и также могут включать 1,5, 2, 2,75 и 3,80, когда речь идет, например, об измерениях). Перечисление конечных точек также включает сами значения конечных точек (например, от 1,0 до 5,0 включает как 1,0, так и 5,0). Любой числовой диапазон, приведенный в данном документе, предназначен для включения всех поддиапазонов, включенных в него.

Ссылка по всему данному описанию на "один вариант реализации" или "вариант реализации" означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанная в связи с вариантом реализации, включена по меньшей мере в один вариант реализации данного изобретения. Таким образом, появление фраз "в одном варианте реализации" или "в варианте реализации" в различных местах в данном описании не обязательно относится к одному и тому же варианту реализации, но такой вариант возможен. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть объединены любым подходящим способом, как будет очевидно для специалиста в данной области техники из этого раскрытия, в одном или более вариантах реализации. Кроме того, хотя некоторые варианты реализации, описанные в данном документе, включают некоторые, но не другие признаки, включенные в другие варианты реализации, сочетания признаков различных вариантов реализации должны находиться в пределах объема изобретения и формировать различные варианты реализации, как будет понятно специалистам в данной области техники. Например, в следующей формуле изобретения любой из заявленных вариантов реализации может использоваться в любой комбинации.

Если не указано иное, все термины, используемые при раскрытии данного изобретения, включая технические и научные термины, имеют значение, общепринятое для специалиста в данной области техники, к которой относится данное изобретение. Посредством дальнейшего руководства определения терминов, используемых в данном описании, включены для лучшего понимания сущности данного изобретения.

При описании данного изобретения используемые термины следует истолковывать в соответствии со следующими определениями, если контекст не требует иного.

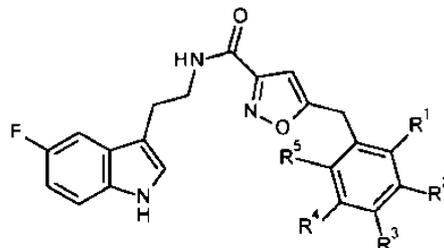
Термины, описанные выше, и другие термины, используемые в описании, хорошо понятны специалистам в данной области техники.

Каждый раз, когда используется в данном изобретении, термин "соединения по данному изобретению" или подобный термин подразумевает включение соединений общей формулы (I) и любой их подгруппы. Данный термин также относится к соединениям, приведенным в табл. 1, и их производным, N-оксидам, солям, сольватам, гидратам, таутомерным формам, аналогам, пролекарствам, сложным эфирам и метаболитам, а также к их кватернизованным азотсодержащим аналогам. Предполагается, что N-оксидные формы указанных соединений включают соединения, в которых один или более атомов азота

окислены до так называемого N-оксида.

Далее изложены предпочтительные положения (признаки) и варианты реализации соединений и способов по данному изобретению. Каждое утверждение и варианты реализации данного изобретения, определенные таким образом, могут быть объединены с любым другим утверждением и/или вариантами реализации, если не указано иное. В частности, любой признак, указанный как предпочтительный или выгодный, может быть объединен с любым другим признаком или признаками, указанными как предпочтительный или выгодный. При этом данное изобретение, в частности, охватывается любой или любой комбинацией одного или более из приведенных ниже утверждений 1-15 и вариантов реализации с любыми другими аспектами и/или вариантом реализации.

1. Соединение формулы (I) или его таутомер,



(I)

где,

R¹ выбран из группы, состоящей из водорода и F;

R² выбран из группы, состоящей из водорода и F;

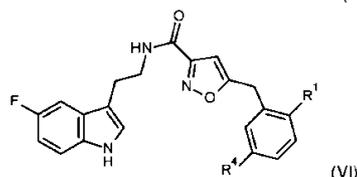
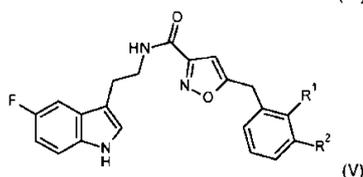
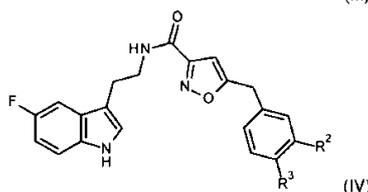
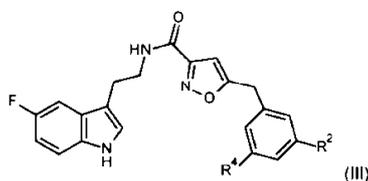
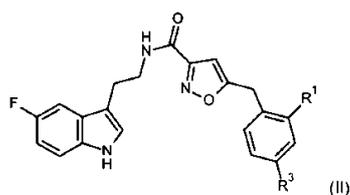
R³ выбран из группы, состоящей из водорода и F;

R⁴ выбран из группы, состоящей из водорода и F;

R⁵ выбран из группы, состоящей из водорода и F;

при условии, что по меньшей мере один из R¹, R², R³, R⁴ или R⁵ не является водородом; при условии, что указанное соединение формулы (I) не является N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]-5-[(3-фторфенил)метил]изоксазол-3-карбоксамидом, или фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по утверждению 1, имеющее любую из формул (II), (III), (IV), (V) или (VI):



где R^1 , R^2 , R^3 и R^4 имеют такие же значения, как определено в п.1.

3. Соединение по утверждению 1 или 2, где R^2 , R^3 , R^4 и R^5 представляют собой водород, причем R^1 представляет собой F.

4. Соединение по утверждению 1 или 2, где R^1 , R^2 , R^4 и R^5 представляют собой водород и R^3 представляет собой F.

5. Соединение по утверждению 1 или 2, где R^2 , R^4 и R^5 представляют собой водород и R^1 и R^3 независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и F.

6. Соединение по утверждению 1 или 2, где R^1 , R^4 и R^5 представляют собой водород и R^2 и R^3 независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и F.

7. Соединение по утверждению 1 или 2, где R^1 , R^3 и R^5 представляют собой водород и R^2 и R^4 независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и F.

8. Соединение по утверждению 1 или 2, где R^3 , R^4 и R^5 представляют собой водород и R^1 и R^2 независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и F.

9. Соединение по утверждению 1 или 2, где R^2 , R^3 , и R^5 представляют собой водород и R^1 и R^4 независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и F.

10. Соединение по утверждению 1, выбранное из группы, состоящей из

5-[(2,4-дифторфенил)метил]-N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]изоксазол-3-карбоксамид;

N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]-5-[(4-фторфенил)метил]изоксазол-3-карбоксамид;

5-[(2,3-дифторфенил)метил]-N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]изоксазол-3-карбоксамид;

5-[(2,5-дифторфенил)метил]-N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]изоксазол-3-карбоксамид;

N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]-5-[(2-фторфенил)метил]изоксазол-3-карбоксамид;

5-[(3,4-дифторфенил)метил]-N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]изоксазол-3-карбоксамид;

5-[(3,5-дифторфенил)метил]-N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]изоксазол-3-карбоксамид.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая одно или более фармацевтических вспомогательных соединений и терапевтически эффективное количество соединения по любому из утверждений 1-10 и его фармацевтически приемлемой соли.

12. Применение соединения по любому из утверждений 1-10 или фармацевтической композиции по утверждению 11 в качестве лекарственного средства.

13. Применение соединения по любому из утверждений 1-10 или фармацевтической композиции по утверждению 11 в качестве лекарственного средства для профилактики и/или лечения эпилепсии, нейро-

дегенеративных расстройств, болевых расстройств, тревожных расстройств, депрессии, биполярного расстройства, психоза, синдрома отмены лекарственного средства, табака, потери памяти, деменции, шизофрении и паники.

14. Применение по утверждению 13, где эпилепсия выбрана из группы, состоящей из рефрактерной эпилепсии, синдрома Веста, синдрома Доуса, доброкачественной роландической эпилепсии, синдрома Расмуссена, синдрома Леннокса-Гасто, синдрома Стердж-Вебера, ювенильной миоклонической эпилепсии, абсансной эпилепсии у детей, эпилепсии, связанной с идиопатической локализацией, эпилепсии височной доли, парциальных судорог, простых парциальных судорог, тонических судорог, тонико-клонических судорог, клонических судорог, миоклонических судорог, абсансных судорог и атонических судорог, эпилепсии лобной доли, эпилепсии с большими эпилептическими припадками, генерализованной эпилепсии, идиопатической эпилепсии, симптоматической эпилепсии и криптогенной эпилепсии.

15. Применение по утверждению 13, где нейродегенеративное расстройство выбрано из группы, состоящей из болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, диффузной болезни телец Леви, бокового амиотрофического склероза, болезни Ниманна-Пика, синдрома Халлервордена-Шпатца, синдрома Дауна, нейроаксональной дистрофии, множественной системной атрофии, болезни Хантингтона, лобно-височной лобарной дегенерации (FTLD), цистического фиброза и болезни Крейтцфельда-Якоба.

Соединения по данному изобретению могут быть в форме солей, предпочтительно фармацевтически приемлемых солей, как, в общем, описано ниже. Некоторые предпочтительные, но не ограничивающие примеры подходящих фармацевтически приемлемых органических и/или неорганических кислот представляют собой соляную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, уксусную кислоту и лимонную кислоту, а также другие фармацевтически приемлемые кислоты, известные как таковые (для которых приводится ссылка на предшествующий уровень техники, упомянутый ниже).

В случае если соединения по данному изобретению содержат кислотную группу, а также основную группу, соединения по данному изобретению также могут образовывать внутренние соли, и такие соединения входят в объем данного изобретения. В случае если соединения по данному изобретению содержат водород-донорный гетероатом (например, NH), в данном изобретении также предложены соли и/или изомеры, образованные путем переноса указанного атома водорода в основную группу или атом молекулы.

Фармацевтически приемлемые соли соединений формулы (I) и любых их подгрупп включают соли присоединения кислоты и основания. Подходящие кислотно-аддитивные соли образуются из кислот, которые образуют нетоксичные соли. Примеры включают ацетат, адипин, аспартат, бензоат, бесилат, бикарбонат/карбонат, бисульфат/сульфат, борат, камсилат, цитрат, цикламат, эдисилат, эзилат, формиат, фумарат, глюцептат, глюконат, глюкуронат, гексафторфосфат, гибензат, гидрохлорид/хлорид, гидробромид/бромид, гидройодид/йодид, изетионат, лактат, малат, малеат, малонат, мезилат, метилсульфат, нафтиллат, 2-напсилат, никотинат, нитрат, оротат, оксалат, пальмитат, памоат, фосфат/гидрофосфат/дигидрофосфат, пироглутамат, сахарат, стеарат, сукцинат, таннат, тартрат, тозилат, трифторацетат и ксинофоат. Подходящие основные соли образуются из оснований, которые образуют нетоксичные соли. Примеры включают соли алюминия, аргинина, бензатина, кальция, холина, диэтиламина, диоламина, глицина, лизина, магния, меглумина, оламина, калия, натрия, трометамин и цинка. Могут также образовываться полусоли из кислот и оснований, например соли полисульфата и гемикальция. Для обзора подходящих солей см. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use by Stahl and Wermuth (Wiley-VCH, 2002), включенные в настоящий документ в качестве ссылки.

Соединения по данному изобретению могут существовать в комплексе твердых состояний в диапазоне от полностью аморфного до полностью кристаллического. Термин "аморфный" относится к состоянию, в котором вещество не имеет дальнего порядка на молекулярном уровне и, в зависимости от температуры, может проявлять физические свойства твердого вещества или жидкости. Обычно такие вещества не дают характерных рентгенограмм и, хотя они проявляют свойства твердого тела, более формально описываются как жидкость. При нагревании происходит изменение свойств твердого вещества на жидкое, которое характеризуется изменением состояния, обычно второго порядка ("переход в стеклообразное состояние"). Термин "кристаллический" относится к твердой фазе, в которой материал имеет упорядоченную внутреннюю структуру на молекулярном уровне и дает характерную рентгенограмму с определенными пиками. Такие материалы при достаточном нагревании также будут проявлять свойства жидкости, но при переходе от твердого к жидкому характерно изменение фазы, обычно первого порядка ("точка плавления").

Фармацевтически приемлемые соли соединений формулы (I) могут быть получены одним или более из следующих способов: (i) путем приведения в контакт соединения формулы (I) с желаемой кислотой; (ii) путем приведения в контакт соединения формулы (I) с желаемым основанием; (iii) путем удаления лабильной кислотной или щелочной защитной группы из подходящего предшественника соединения формулы (I) или путем раскрытия цикла подходящего циклического предшественника, например лактона или лактама, с использованием желаемой кислоты; или (iv) путем превращения одной соли соединения формулы (I) в другую путем приведения в контакт с подходящей кислотой или с помощью подходящей ионообменной колонки.

Все данные реакции обычно проводятся в растворе. Соль может выпадать в осадок из раствора и может быть собрана с помощью фильтрования или может быть извлечена выпариванием растворителя. Степень ионизации в соли может варьироваться от полностью ионизированной до почти неионизированной.

Соединения по данному изобретению также могут существовать в несольватированной и сольватированной формах. Термин "сольват", в контексте данного документа, используется для описания молекулярного комплекса, включающего соединение по данному изобретению и одну или более молекул фармацевтически приемлемого растворителя, например этанола. Термин "гидрат" используется, когда указанным растворителем является вода.

В настоящее время принятой системой классификации органических гидратов является система, которая определяет изолированный сайт, канал или гидраты, координированные ионами металлов - см. Polymorphism in Pharmaceutical Solids by K. R. Morris (Ed. H. G. Britain, Marcel Dekker, 1995), включенный в данный документ в качестве ссылки. Гидраты с изолированным участком представляют собой гидраты, в которых молекулы воды изолированы от прямого контакта друг с другом путем приведения в контакт органических молекул. В канальных гидратах молекулы воды лежат в решетчатых каналах, где они находятся рядом с другими молекулами воды. В гидратах, координированных ионами металлов, молекулы воды связаны с ионом металла.

В случае если растворитель или вода тесно связаны, комплекс будет иметь четко определенную стехиометрию, независимо от влажности. Однако когда растворитель или вода слабо связаны, как в канальных сольватах и гигроскопичных соединениях, содержание воды/растворителя будет зависеть от влажности и условий сушки. В таких случаях нестехиометрия будет являться нормой.

Также в объем данного изобретения включены многокомпонентные комплексы (отличные от солей и сольватов), в которых лекарственное средство и по меньшей мере один другой компонент присутствуют в стехиометрических или нестехиометрических количествах. Комплексы данного типа включают клатраты (комплексы включения лекарственное средство-хозяин) и кокристаллы. Последние обычно определяются как кристаллические комплексы нейтральных молекулярных компонентов, которые связаны друг с другом посредством нековалентных взаимодействий, но также могут представлять собой комплекс нейтральной молекулы с солью. Кокристаллы могут быть получены кристаллизацией из расплава, перекристаллизацией из растворителей или физическим измельчением компонентов вместе - см. Chem Commun, 17, 1889-1896, O. Almarsson and M.J. Zaworotko (2004), включенные в настоящий документ посредством ссылки. Для общего обзора многокомпонентных комплексов, см. J Pharm Sci, 64 (8), 1269-1288, by Haleblan (August 1975), включенный в настоящий документ в качестве ссылки.

Соединения по данному изобретению также могут существовать в мезоморфном состоянии (мезофазный или жидкий кристалл) при воздействии подходящих условий. Мезоморфное состояние является промежуточным между истинным кристаллическим состоянием и истинным жидким состоянием (расплав или раствор). Мезоморфизм, возникающий в результате изменения температуры, описывается как "термотропный", а мезоморфизм, возникающий в результате добавления второго компонента, такого как вода или другой растворитель, описывается как "лиотропный". Соединения, которые могут образовывать лиотропные мезофазы, описаны как "амфифильные" и состоят из молекул, которые обладают ионным (таким как $-\text{COO}^-\text{Na}^+$, $-\text{COO}^-\text{K}^+$ или $-\text{SO}_3^-\text{Na}^+$) или неионным (таким как $-\text{N}^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$) полярная головная группа. Для получения дополнительной информации см. Crystals and the Polarizing Microscope by N. H. Hartshorne and A. Stuart, 4th Edition (Edward Arnold, 1970), включенный в настоящий документ посредством ссылки.

Все ссылки на соединения формулы (I) или любые их подгруппы включают ссылки на соли, сольваты, многокомпонентные комплексы и их жидкие кристаллы, а также на сольваты, многокомпонентные комплексы и жидкие кристаллы их солей.

Соединения по данному изобретению включают соединения формулы (I) или любые их подгруппы, как определено выше, включая все полиморфы и их кристаллические структуры, их пролекарства и изомеры (включая оптические, геометрические и таутомерные изомеры), как определено ниже, и изотопно-меченные соединения формулы (I).

Кроме того, хотя обычно в отношении солей соединений по данному изобретению фармацевтически приемлемые соли являются предпочтительными, следует отметить, что изобретение в его самом широком смысле также включает фармацевтически не приемлемые соли, которые могут, например, использоваться в выделении и/или очистки соединений по данному изобретению.

В данном изобретении также в целом охватываются все фармацевтически приемлемые пролекарства или "предварительные лекарственные средства" соединений формулы (I) или любых их подгрупп, для которых приведена общая ссылка на известный уровень техники, цитируемый ниже.

Термин "пролекарство" в контексте данного документа означает фармакологически приемлемые производные, такие как сложные эфиры, амиды и фосфаты, так что полученный продукт биотрансформации *in vivo* производного является активным лекарственным средством. Ссылка на Goodman and Gilman (The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th Ed, McGraw-Hill, Int. Ed. 1992, "Biotransformation of Drugs", p 13-15), описывающая пролекарства, как правило, включена. Пролекарства соединений по данному изобретению могут быть получены путем модификации функциональных групп, присутствующих

в указанном компоненте, таким образом, что модификации расщепляются, либо в ходе обычных манипуляций, либо *in vivo*, до исходного компонента. Типичные примеры пролекарств описаны, например, в WO 99/33795, WO 99/33815, WO 99/33793 и WO 99/33792, которые все включены в настоящий документ посредством ссылки. Пролекарства характеризуются повышенной биодоступностью и легко метаболизируются в активные ингибиторы *in vivo*. Термин "пролекарство" в контексте данного документа, означает любое соединение, которое будет модифицировано для образования вида лекарственного средства, причем модификация может происходить либо внутри, либо снаружи организма, а также до или после того, как предварительное лекарственное средство достигает область тела, где указано применение лекарственного средства.

В объем данного изобретения входят все геометрические изомеры и таутомерные формы соединений формулы (I) или любых их подгрупп, включая соединения, проявляющие более одного типа изомерии, и смеси одного или более из них. Также включены кислотно-аддитивные или основные соли, в которых противоион является оптически активным, например d-лактат или l-лизин, или рацемат, например dl-тарtrat или dl-аргинин.

Цис/транс-изомеры могут быть разделены с помощью обычных способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, например хроматографией и фракционной кристаллизацией.

Обычные способы получения/выделения отдельных энантиомеров включают хиральный синтез из подходящего оптически чистого предшественника или разделение рацемата (или рацемата соли или производного) с использованием, например, хиральной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Соединения формулы (I) или любые их подгруппы могут быть получены, как описано в экспериментальном разделе ниже, с использованием способов и реакций, хорошо известных специалистам в данной области техники.

В данном изобретении также предлагается фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одно соединение по данному изобретению. В данном изобретении также предлагаются фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одно соединение по данному изобретению и по меньшей мере один носитель, вспомогательное вещество или разбавитель, приемлемые для фармацевтических целей.

В некоторых вариантах реализации данное изобретение относится к применению по меньшей мере одного соединения формулы (I) или любых его подгрупп в (приготовлении композиции для) профилактики и/или лечения эпилепсии, нейродегенеративных расстройств, болевых расстройств, тревожных расстройств, депрессии, биполярного расстройства, психоза, отмены лекарственного средства, отмены табака, потери памяти, деменции, шизофрении и паники.

В некоторых вариантах реализации данное изобретение относится к способу профилактики и/или лечения эпилепсии, нейродегенеративных расстройств, болевых расстройств, тревожных расстройств, депрессии, биполярного расстройства, психоза, отмены лекарственного средства, табака, потери памяти, деменции, шизофрении, паники, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества по меньшей мере одного соединения формулы (I) или любых его подгрупп или фармацевтической композиции, содержащей указанное по меньшей мере одно соединение формулы (I) или любые его подгруппы.

В некоторых вариантах реализации данное изобретение относится к применению по меньшей мере одного соединения формулы (I) или любых его подгрупп в (приготовлении композиции для) профилактики и/или лечения эпилепсии, нейродегенеративных нарушений, болевых расстройств, тревожных расстройств, депрессии, биполярного расстройства, психоза, отмены лекарственного средства, отмены табака, потери памяти, деменции, шизофрении, паники; более предпочтительно эпилепсии и нейродегенеративных нарушений, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, деменции с тельцами Леви, бокового амиотрофического склероза, болезни Ниманна-Пика, болезни Галлервордена-Шпатца, синдрома Дауна, нейроаксональной дистрофии, множественной системной атрофии, болезни Хантингтона, лобно-височной лобарной дегенерации (FTLD), множественной системной атрофии, цистического фиброза, болезни Крейтцфельда-Якоба; еще более предпочтительно для профилактики и/или лечения эпилепсии и/или болезни Альцгеймера.

В некоторых вариантах реализации данное изобретение относится к применению по меньшей мере одного соединения формулы (I) или любых его подгрупп в (приготовлении композиции для) профилактики и/или лечения эпилепсии, причем предпочтительно эпилепсии, выбранной из группы, состоящей из рефрактерной эпилепсии, синдрома Веста, синдрома Доуса, доброкачественной роландической эпилепсии, синдрома Расмуссена, синдрома Леннокса-Гасто, синдрома Веста, синдрома Стерга-Вебера, ювенильной миоклонической эпилепсии, детской абсансной эпилепсии, идиопатической локализационно-обусловленной эпилепсии, височной эпилепсии, парциальных приступов, простого парциального припадка, тонических судорог, тонико-клонических судорог, клонических судорог, миоклонических судорог, малых эпилептических приступов и атонических приступов, эпилепсии лобной доли, эпилепсии с большим эпилептическим припадком, генерализованной эпилепсии, идиопатической эпилепсии, симптоматической эпилепсии и криптогенной эпилепсии.

В некоторых вариантах реализации данное изобретение относится к применению по меньшей мере одного соединения формулы (I) или любых его подгрупп в (приготовлении композиции для) профилактики и/или лечения болевых расстройств, причем предпочтительно болевых расстройств, выбранных из группы, состоящей из острой боли, постоянной боли, хронической боли, воспалительной боли и невропатической боли.

В некоторых вариантах реализации данное изобретение относится к применению по меньшей мере одного соединения формулы (I) или любых его подгрупп в (приготовлении композиции для) профилактики и/или лечения тревожных расстройств, причем предпочтительно тревожных расстройств, выбранных из группы, состоящей из панической атаки, агорафобии или специфической фобии, обсессивно-компульсивного расстройства, посттравматического стресса, острого стрессового расстройства, общего тревожного расстройства, нарушения пищевого поведения, индуцированного веществом тревожного расстройства и неопределенного тревожного расстройства.

Термин "субъект" в контексте данного документа относится к млекопитающему. Субъектом предпочтительно является человек, но также может быть домашний скот, лабораторные или домашние животные.

В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одно соединение формулы (I) используется (для приготовления лекарственного средства) для профилактики и/или лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из эпилепсии, нейродегенеративных нарушений, болевых расстройств, тревожных расстройств, депрессии, биполярного расстройства, психоза, отмены лекарственного средства, табака, потери памяти, деменции, шизофрении и паники, и/или для предотвращения, лечения и/или облегчения осложнений и/или симптомов, связанных с ними.

Термин "эффективное количество", в контексте данного документа, означает количество лекарственного или фармацевтического средства, которое вызывает биологический или медицинский ответ ткани, системы, животного или человека, которое запрашивается, например, исследователем или клиницистом.

Термин "терапевтически эффективное количество" означает любое количество, которое по сравнению с соответствующим субъектом, который не получил такое количество, приводит к улучшению лечения, заживления, профилактики или ослабления заболевания, расстройства или побочного эффекта, или уменьшению скорости развития заболевания или расстройства. Термин также включает объем количества, эффективные для улучшения нормальной физиологической функции.

Для применения в терапии терапевтически эффективные количества соединения формулы (I), а также его таутомеров, солей, гидратов или сольватов можно вводить в виде неочищенного химического вещества. Кроме того, активный ингредиент может быть представлен в виде фармацевтической композиции.

Соответственно в данном изобретении также предлагаются фармацевтические композиции, которые включают эффективные количества соединений формулы (I) или их таутомеров, солей, гидратов, сольватов или пролекарств, и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ. Соединения формулы (I) или их таутомеры, соли, гидраты или сольваты являются такими, как описано в данном документе.

Соединения по данному изобретению могут вводиться в виде единственного активного ингредиента или вместе, то есть в фиксированной или свободной комбинации, с другими терапевтическими агентами, используемыми в клинической практике для лечения перечисленных выше заболеваний.

Соединения по данному изобретению и другие фармацевтические активные агенты могут быть введены вместе или по отдельности, а при отдельном введении, введение может происходить одновременно или последовательно, в любом порядке. Количество соединений согласно данному изобретению и другого фармацевтически активного агента(ов) и относительные сроки введения будут выбираться для достижения желаемого комбинированного терапевтического эффекта. Введение в комбинации соединения формулы (I) или его таутомера, соли, гидрата или сольвата с другими агентами для лечения может быть в комбинации путем введения одновременно в (1) одной фармацевтической композиции, содержащей оба соединения; или (2) отдельной фармацевтической композиции, каждая из которых включает одно из соединений. Альтернативно комбинация может вводиться отдельно последовательно, при этом одно лечебное средство вводится первым, а другое - вторым или наоборот. Такое последовательное введение может быть близким по времени или удаленным по времени.

Для фармацевтического применения соединения по данному изобретению можно использовать в виде свободной кислоты или основания, и/или в форме фармацевтически приемлемой соли присоединения кислоты и/или основания (например, полученной с нетоксичной органической или неорганической кислотой или основанием), в форме гидрата, сольвата и/или комплекса, и/или в форме пролекарства или предлекарства, такого как сложный эфир. Используемый в данном документе, если не указано иное, термин "сольват" включает любую комбинацию, которая может быть образована соединением по данному изобретению с подходящим неорганическим растворителем (например, гидратами) или органическим растворителем, таким как, но не ограничиваясь, спирты, кетоны, сложные эфиры и тому подобное. Такие соли, гидраты, сольваты и т.д. и их получение будут понятны специалисту в данной области техники;

приводится ссылка, например, на соли, гидраты, сольваты и т.д., описанные в патентах США № 6372778, 6369086, 6369087 и 6372733.

Фармацевтически приемлемые соли соединений по данному изобретению, то есть в форме водорастворимых, или маслорастворимых, или диспергируемых продуктов, включают обычные нетоксичные соли или соли четвертичного аммония, которые образуются, например, из неорганических или органических кислоты или основания. Примеры таких кислотно-аддитивных солей включают ацетат, адипат, альгинат, аспарат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат, бутират, цитрат, камфорат, камфорсульфонат, циклопентанепропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептаноат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидрохлорид, гидробромид, гидроиодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактат, малеат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, оксалат, пальмоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, пикрат, пивалат, пропионат, сукцинат, тартрат, тиоцианат, тозилат и ундеканат. Основные соли включают соли аммония, соли щелочных металлов, такие как соли натрия и калия, соли щелочноземельных металлов, такие как соли кальция и магния, соли с органическими основаниями, такими как соли дициклогексиламины, N-метил-D-глюкамин, и соли с аминокислотами, такими как как аргинин, лизин и так далее. Кроме того, основные азотсодержащие группы могут быть кватернизованы такими агентами, как низшие алкилгалогениды, такие как метил, этил, пропи-л и бутилхлорид, бромиды и йодиды; диалкилсульфаты, такие как диметил, диэтил, дибутыл; и диамилсульфаты, галогениды с длинной цепью, такие как децил, лаурил, миристил и стеарилхлориды, бромиды и йодиды, аралкилгалогениды, такие как бензил и фенетилбромиды, и другие. Другие фармацевтически приемлемые соли включают соль серной кислоты этанолята и сульфаты.

Как правило, для фармацевтического применения соединения по данному изобретению могут быть составлены в виде фармацевтического препарата, содержащего по меньшей мере одно соединение по данному изобретению и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество и/или адъювант и необязательно одно или более других фармацевтически активных соединений.

Посредством неограничивающих примеров такая композиция может быть в форме, подходящей для перорального введения, для парентерального введения (такого как внутривенная, внутримышечная или подкожная инъекция или внутривенная инфузия), для местного введения (включая в глаз), для введения посредством ингаляции, кожный пластырь, имплантат, суппозиторий и т.д. Такие подходящие формы введения, которые могут быть твердыми, полутвердыми или жидкими, в зависимости от способа введения, а также способы и носители, разбавители и вспомогательные вещества для использования при их приготовлении, будут понятны специалисту в данной области техники; еще раз приводится ссылка на, например, США 6372778, 6369086, 6369087 и 6372733, а также на стандартные справочники, такие как последнее издание Remington's Pharmaceutical Sciences.

Некоторые предпочтительные, но не ограничивающие примеры таких препаратов включают таблетки, пилюли, порошки, пастилки, саше, эликсиры, суспензии, эмульсии, растворы, сиропы, аэрозоли, мази, кремы, лосьоны, мягкие и твердые желатиновые капсулы, суппозитории, капли, стерильные растворы для инъекций и стерильные упакованные порошки (которые обычно восстанавливают перед использованием) для введения в виде болюса и/или для непрерывного введения, которые могут быть составлены с носителями, вспомогательными веществами и разбавителями, которые сами по себе подходят для таких композиций, такие как лактоза, декстроза, сахароза, сорбит, маннит, крахмалы, арабийская камедь, фосфат кальция, альгинаты, трагакант, желатин, силикат кальция, микрокристаллическая целлюлоза, поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль, целлюлоза, (стерильная) вода, метилцеллюлоза, метил- и пропилигидроксibenзоаты, тальк, стеарат магния, пищевые масла, растительные масла и минеральные масла, или их подходящие смеси. Композиции могут необязательно содержать другие фармацевтически активные вещества (которые могут или не могут приводить к синергетическому эффекту с соединениями по данному изобретению) и другие вещества, которые обычно используются в фармацевтических композициях, такие как смазывающие агенты, смачивающие агенты, эмульгирующие и суспендирующие агенты, диспергирующие агенты, дезинтегранты, объемобразующие агенты, наполнители, консерванты, подсластители, ароматизаторы, регуляторы потока, разделительные агенты и т.д. Композиции также могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечить быстрое, пролонгированное или модифицированное высвобождение содержащегося в них активного(ых) соединения(ий), например с использованием липосом или гидрофильных полимерных матриц на основе натуральных гелей или синтетических полимеров. Чтобы повысить растворимость и/или стабильность соединений фармацевтической композиции по данному изобретению, может быть выгодно использовать α -, β - или γ -циклодекстрины или их производные. Кроме того, сорастворители, такие как спирты, могут улучшить растворимость и/или стабильность соединений. При приготовлении водных композиций добавление солей соединений по данному изобретению может быть более подходящим из-за их повышенной растворимости в воде.

Подходящими циклодекстринами являются α -, β - или γ -циклодекстрины (CD) или их простые и смешанные простые эфиры, где одна или более гидроксильных групп ангидроглюкозных звеньев циклодекстрина замещены алкилом, в частности метилом, этилом или изопропилом, например метилирован-

ным случайным образом β -CD; гидроксиалкилом, в частности, гидроксиэтилом, гидроксипропилом или гидроксibuтилом; карбоксиалкилом, в частности карбоксиметилом или карбоксиэтилом; алкилкарбониллом, в частности, ацетилом; алкоксикарбонилалкилом или карбоксиалкоксиалкилом, особенно карбоксиметоксипропилом или карбоксиэтоксипропилом; алкилкарбонилоксиалкилом, особенно 2-ацетилоксипропилом. Особенно примечательными в качестве комплексообразователей и/или солюбилизаторов являются β -CD, случайно метилированный β -CD, 2,6-диметил- β -CD, 2-гидроксиэтил- β -CO, 2-гидроксиэтил- γ -CD, 2-гидроксипропил- γ -CD и (2-карбоксиметокси)пропил- β -CD и, в частности, 2-гидроксипропил- β -CD (2-HP- β -CD). Термин "смешанный эфир" обозначает производные циклодекстрина, в которых по меньшей мере две гидроксильные группы циклодекстрина этерифицированы различными группами, такими как, например, гидроксипропил и гидроксиэтил. Интересный способ составления соединений в комбинации с циклодекстрином или его производным был описан в EP-A-721331. Хотя описанные в данном документе композиции содержат противогрибковые активные ингредиенты, они одинаково интересны для составления соединений. Указанные композиции также могут быть составлены более приятными на вкус, путем добавления фармацевтически приемлемых подсластителей и/или ароматизаторов. В частности, в данном изобретении предлагается фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество соединения по данному изобретению с фармацевтически приемлемым циклодекстрином. В данном изобретении также предлагаются комплексы циклодекстрина, состоящие из соединения согласно данного изобретения и циклодекстрина.

Предпочтительно упоминаются композиции, составы (и носители, вспомогательные вещества, добавки и т.д. для их использования), пути введения и т.д., которые известны сами по себе, например такие, как описанные в США-4997834 и EP-A-0370498.

Более конкретно, композиции могут быть составлены в виде фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество частиц, состоящих из твердой дисперсии соединений по изобретению и одного или более фармацевтически приемлемых водорастворимых полимеров.

Термин "твердая дисперсия" определяет систему в твердом состоянии (в отличие от жидкого или газообразного состояния), содержащую по меньшей мере два компонента, причем один компонент более или менее равномерно распределен по всему другому компоненту или компонентам. Когда указанная дисперсия компонентов является таковой, что система является химически и физически однородной или полностью гомогенной или состоит из одной фазы, как определено в термодинамике, такую твердую дисперсию называют "твердым раствором". Твердые растворы являются предпочтительными физическими системами, потому что компоненты в них обычно легко биодоступны для организмов, которым они вводятся. Термин "твердая дисперсия" также включает дисперсии, которые являются менее гомогенными, чем твердые растворы. Такие дисперсии не являются химически и физически однородными или содержат более одной фазы.

Водорастворимый полимер обычно представляет собой полимер, который имеет кажущуюся вязкость от 1 до 100 мПа с при растворении в 2% водном растворе при температуре 20°C. Предпочтительными водорастворимыми полимерами являются гидроксипропилметилцеллюлозы или ГПМЦ. ГПМЦ, имеющие степень замещения метокси от около 0,8 до около 2,5 и гидроксипропил молярное замещение от около 0,05 до около 3,0, обычно растворимы в воде. Степень замещения метокси относится к среднему количеству метальных простозэфирных групп, присутствующих на единицу ангидроглюкозы молекулы целлюлозы. Гидроксипропил молярное замещение относится к среднему числу моль оксида пропиленна, которые прореагировали с каждой единицей ангидроглюкозы молекулы целлюлозы.

Кроме того, может быть удобно составлять соединения в форме наночастиц, которые имеют модификатор поверхности, адсорбированный на их поверхности, в количестве, достаточном для поддержания эффективного среднего размера частиц менее чем 1000 нм. Подходящие модификаторы поверхности предпочтительно могут быть выбраны из известных органических и неорганических фармацевтических вспомогательных веществ. Такие вспомогательные вещества включают различные полимеры, низкомолекулярные олигомеры, натуральные продукты и поверхностно-активные вещества. Предпочтительные модификаторы поверхности включают неионогенные и анионогенные поверхностно-активные вещества.

Еще один интересный способ составления соединений по изобретению включает фармацевтическую композицию, в которой соединения включаются в гидрофильные полимеры, и нанесение этой смеси в виде пленочного покрытия на множество мелких шариков, таким образом, получая композицию с хорошей биодоступностью, которая может быть удобно изготовлена и пригодна для приготовления фармацевтических лекарственных форм для перорального применения. Указанные шарики содержат (а) центральное, округлое или сферическое ядро, (b) пленочное покрытие из гидрофильного полимера и антиретровирусного агента и (с) полимерный слой с герметизирующим покрытием. Материалы, подходящие для использования в качестве ядер в гранулах, являются разнообразными при условии, что указанные материалы являются фармацевтически приемлемыми и имеют соответствующие размеры и твердость. Примерами таких материалов являются полимеры, неорганические вещества, органические вещества и сахараиды и их производные.

Композиции могут быть получены известным способом, который обычно включает смешивание по

меньшей мере одного соединения по изобретению с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями и, при желании, в сочетании с другими фармацевтически активными соединениями, когда это необходимо, в асептических условиях. См. ссылки на США А-6372778, А-6369086, А-6369087 и А-6372733 и на другой уровень техники, упомянутый выше, а также на стандартные руководства, такие как последнее издание Remington's Pharmaceutical Sciences.

Фармацевтические композиции по изобретению предпочтительно находятся в единичной дозированной форме и могут быть надлежащим образом упакованы, например, в коробку, блистер, виалу, флакон, саше, ампулу или в любую другую подходящую одно-или многодозовую емкость или контейнер (который может быть надлежащим образом маркирован); необязательно с одной или более инструкциями-вкладышами, содержащими информацию о продукте и/или инструкции по применению. Обычно такие единицы дозы будут содержать от 1 до 1000 мг и обычно от 5 до 500 мг по меньшей мере одного соединения по изобретению, например около 10, 25, 50, 100, 200, 300 или 400 мг на единицу дозы.

Соединения могут вводиться различными путями, включая пероральный, глазной, ректальный, трансдермальный, подкожный, внутривенный, внутримышечный или интраназальный, в зависимости, главным образом, от конкретной используемой композиции и состояния, подлежащего лечению или профилактики, и пероральное и внутривенное введения обычно являются предпочтительными. По меньшей мере одно соединение по изобретению обычно вводят в "эффективном количестве", под которым подразумевается любое количество соединения формулы (I), указанного выше, которое при подходящем введении является достаточным для достижения желаемого терапевтического или профилактического эффекта у субъекта, которому его вводят. Обычно, в зависимости от состояния, которое необходимо предотвратить или лечить, и от пути введения, такое эффективное количество обычно составляет от 0,01 до 1000 мг/кг, чаще от 0,1 до 500 мг, например от 1 до 250 мг, например около 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200 или 250 мг/кг веса тела пациента в день, такое эффективное количество можно вводить в виде однократной суточной дозы, разделенной на одну или более суточных доз, или по существу непрерывно, например с помощью капельного вливания. Количество, которое должно быть введено, путь введения и дальнейший режим лечения могут быть определены лечащим врачом в зависимости от таких факторов как возраст, пол, общее состояние пациента и характер и серьезность заболевания/симптомов для лечения. См. ссылки на США А-6372778, А-6369086, А-6369087 и А-6372733 и на другой уровень техники, упомянутый выше, а также на стандартные руководства, такие как последнее издание Remington's Pharmaceutical Sciences.

В соответствии со способом настоящего изобретения указанную фармацевтическую композицию можно вводить отдельно в разное время в течение курса терапии или одновременно в разделенных или единичных комбинациях. Следовательно, настоящее изобретение следует понимать как охватывающее все такие режимы одновременного или попеременного лечения, и термин "введение" следует интерпретировать соответствующим образом.

Для получения пероральной формы введения композиции по настоящему изобретению можно смешивать с подходящими добавками, такими как вспомогательные вещества, стабилизаторы или инертные разбавители, и их можно вводить обычными способами в подходящих формах для введения, таких как таблетки, таблетки с покрытием, твердые капсулы, водные, спиртовые или масляные растворы. Примерами подходящих инертных носителей являются гуммиарабик, магнезия, карбонат магния, фосфат калия, лактоза, глюкоза или крахмал, в частности кукурузный крахмал. В этом случае композицию можно проводить как в виде сухих, так и влажных гранул. Подходящими масляными вспомогательными веществами или растворителями являются растительные или животные масла, такие как подсолнечное масло или масло печени трески. Подходящими растворителями для водных или спиртовых растворов являются вода, этанол, растворы сахара или их смеси. Полиэтиленгликоли и полипропиленгликоли также полезны в качестве дополнительных вспомогательных веществ для других форм введения. В качестве таблеток с немедленным высвобождением эти композиции могут содержать микрокристаллическую целлюлозу, дикальций фосфат, крахмал, стеарат магния и лактозу и/или другие вспомогательные вещества, связующие вещества, наполнители, дезинтегранты, разбавители и смазывающие вещества, известные в данной области техники.

При введении с помощью назального аэрозоля или ингаляции эти композиции могут быть приготовлены в соответствии с методиками, хорошо известными в области фармацевтических композиций, и могут быть приготовлены в виде растворов в физиологическом растворе с использованием бензилового спирта или других подходящих консервантов, промоторов абсорбции для улучшения биодоступности, фторуглеродов, и/или других солюбилизующих или диспергирующих агентов, известных в данной области техники. Подходящими фармацевтическими композициями для введения в форме аэрозолей или спреев являются, например, растворы, суспензии или эмульсии соединений по изобретению или их физиологически подходящих солей в фармацевтически приемлемом растворителе, таком как этанол или вода, или смесь таких растворителей. Если требуется, композиция также может дополнительно содержать другие фармацевтические вспомогательные вещества, такие как поверхностно-активные вещества, эмульгаторы и стабилизаторы, а также пропеллент.

Для подкожного или внутривенного введения соединения по изобретению, если желательно, с

обычно используемыми веществами, такими как солюбилизаторы, эмульгаторы или дополнительные вспомогательные вещества, вводят в раствор, суспензию или эмульсию. Соединения по изобретению также можно лиофилизировать и полученные лиофилизаты использовать, например, для приготовления инъекционных или инфузионных композиций. Подходящими растворителями являются, например, вода, физиологический солевой раствор или спирты, например, этанол, пропанол, глицерин, кроме того, также растворы сахара, такие как растворы глюкозы или маннита, или, альтернативно, смеси различных упомянутых растворителей. Инъецируемые растворы или суспензии могут быть составлены в соответствии с известным уровнем техники с использованием подходящих нетоксичных, парентерально приемлемых разбавителей или растворителей, таких как маннит, 1,3-бутандиол, вода, раствор Рингера или изотонический раствор хлорида натрия, или подходящих диспергирующих, или смачивающих и суспендирующих агентов, таких как стерильные, мягкие, фиксированные масла, включая синтетические моно- или диглицериды, и жирные кислоты, включая олеиновую кислоту.

При ректальном введении в форме суппозитория данные композиции могут быть получены путем смешивания соединений по изобретению с подходящим нераздражающим вспомогательным веществом, таким как масло какао, синтетические глицеридные сложные эфиры или полиэтиленгликоли, которые являются твердыми при обычных температурах, но разжижаются и/или растворяются в прямой кишке для высвобождения лекарственного средства.

Композиции представляют ценность в ветеринарной области, которая для целей настоящего изобретения включает не только профилактику и/или лечение заболеваний у животных, но также усиление роста, и/или увеличение веса животного, и/или количества, и/или качества мяса или других продуктов, полученных от экономически важных животных, таких как крупный рогатый скот, свиньи, овцы, курица, рыба. Таким образом, в дополнительном аспекте изобретение относится к (фармацевтической) композиции для ветеринарного применения, которая содержит по меньшей мере одно соединение по изобретению и по меньшей мере один подходящий носитель (то есть носитель, подходящий для ветеринарного применения). Изобретение также относится к применению соединения по изобретению при получении такой композиции.

Примеры

Следующие примеры приведены с целью иллюстрации настоящего изобретения и никоим образом не должны интерпретироваться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Часть А представляет собой получение соединений (промежуточных и конечных соединений), тогда как часть В представляет собой фармакологические примеры.

Часть А.

Соединения были получены в соответствии с двумя различными путями синтеза, показанными на схеме 1 и схеме 2, представленными ниже.

Схема 1

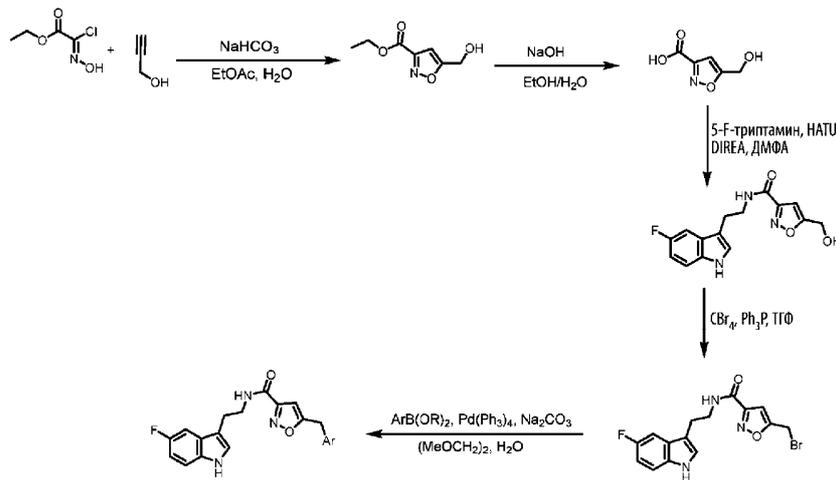
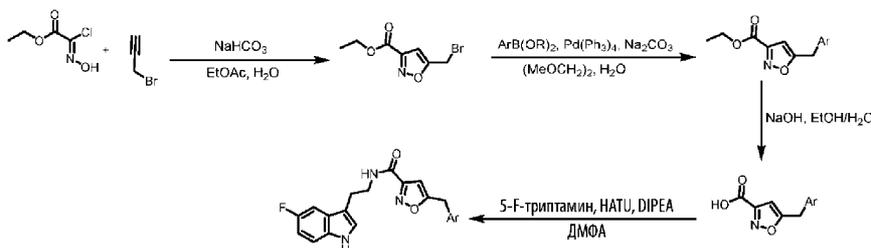
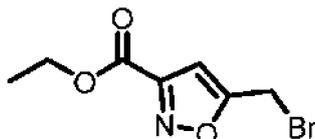


Схема 2

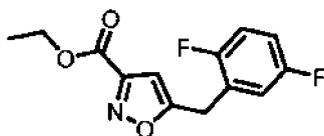


Промежуточное соединение I - получение этил 5-(бромметил)изоксазол-3-карбоксилата.



Раствор этил 2-хлор-2-(гидроксиимино)ацетата (37,6 г, 240,66 ммоль) в 200 мл этилацетата по каплям добавляли при комнатной температуре к смеси 3-бромпроп-1-ина (91 мл; 845 ммоль) бикарбоната натрия (71,48 г; 842 ммоль), этилацетата (1200 мл) и воды (12 мл), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 108 ч. Твердое вещество отфильтровывали и фильтрат дважды промывали водой, сушили над сульфатом магния и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле, используя градиент этилацетата (5-40%) в гептане, с получением 46,1 г (82%) этил 5-(бромметил)изоксазол-3-карбоксилата в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (хлороформ-d) δ : 6,74 (с, 1H), 4,50 (с, 2H), 4,45 (кв, 2H), 1,42 (т, 3H).

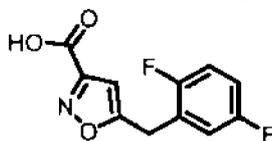
Промежуточное соединение II - получение этил 5-(2,5-дифторбензил)изоксазол-3-карбоксилата.



В двадцать пять сосудов для микроволновой обработки по отдельности загружали этил 5-(бромметил)изоксазол-3-карбоксилат (1,2 г; 5,13 ммоль), 2,5-дифторфенилбороновую кислоту (0,928 г; 5,64 ммоль), тетракис(трифенилфосфин)палладий (0) (0,297 г; 0,256 ммоль), карбонат натрия (1,09 г; 10,25 ммоль) и смесь воды (2 мл) и 1,2-диметоксиэтана (8 мл). Ампулы герметично закрывали и нагревали при 130°C в микроволновой печи в течение 20 мин. Содержимое двадцати пяти ампул объединяли, разбавляли этилацетатом и промывали водой. Органический слой концентрировали при пониженном давлении и остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле, используя градиент этилацетата (5-40%) в гептане, с получением 18,47 г (54%) этил 5-(2,5-дифторбензил)изоксазол-3-карбоксилата в виде желтого масла.

^1H ЯМР (хлороформ-d) δ : 6,90-7,12 (м, 3H), 6,42 (с, 1H), 4,42 (кв, 2H), 4,15 (с, 2H), 1,40 (т, 3H). ИЭР/АРСИ (+): 268 (M+H), 290 (M+Na).

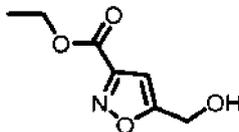
Промежуточное соединение III - получение 5-(2,5-дифторбензил)изоксазол-3-карбоновой кислоты.



1M раствор гидроксида натрия (206 мл; 206 ммоль) добавляли к раствору этил 5-(2,5-дифторбензил)изоксазол-3-карбоксилата (18,30 г; 68,48 ммоль) в этаноле (20 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Раствор подкисляли до pH 1 добавлением 12 н. раствора соляной кислоты. Осадок собирали фильтрованием и сушили при пониженном давлении, получая 14,60 г (89%) 5-(2,5-дифторбензил)изоксазол-3-карбоновой кислоты в виде белого твердого вещества.

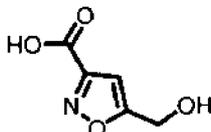
^1H ЯМР (DMSO-d₆) δ : 7,17-7,34 (м, 3H), 6,59 (с, 1H), 4,27 (с, 2H).

Промежуточное соединение IV - получение этил 5-(гидроксиметил)изоксазол-3-карбоксилата.



Пропаргиловый спирт (11,42 мл; 191,36 ммоль) добавляли к смеси этил 2-хлор-2-(гидроксиимино)ацетата (14,50 г; 95,68 ммоль) и гидрокарбоната натрия (16,08 г; 191,36 ммоль) в этилацетате (400 мл) и воде (40 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Две фазы разделяли и органический слой концентрировали при пониженном давлении. Неочищенную смесь очищали флэш-хроматографией на силикагеле (элюируя от 1 до 10% этилацетата в дихлорметане) с получением 8,67 г (53%) этил 5-(гидроксиметил)изоксазол-3-карбоксилата в виде масла.

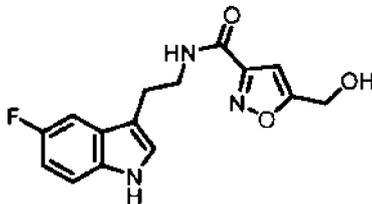
Промежуточное соединение V - получение 5-(гидроксиметил)изоксазол-3-карбоновой кислоты.



Раствор гидроксида натрия в воде (2M; 50 мл) добавляли к смеси этил 5-(гидроксиметил)изоксазол-

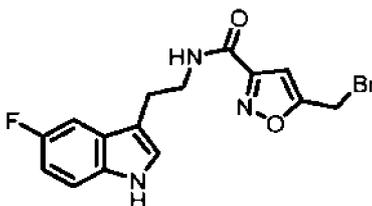
3-карбоксилата (8,67 г; 50,66 ммоль) в этаноле (30 мл) и энергично перемешивали в течение 2 ч. Раствор концентрировали при пониженном давлении, разбавляли водой и экстрагировали дихлорметаном. Водный слой подкисляли до pH 1 с помощью бн. соляной кислоты и еще несколько раз экстрагировали этилацетатом. Органический слой сушили и концентрировали при пониженном давлении, получая 5,43 г (75%) 5-(гидроксиметил)изоксазол-3-карбоновой кислоты в виде белого твердого вещества.

Промежуточное соединение VI - получение N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)-5-(гидроксиметил)изоксазол-3-карбоксамид.



N, N-диизопропилэтиламин (10,75 мл; 58,23 ммоль) добавляли к смеси гидрохлорида 2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этанамин (5,00 г; 23,29 ммоль), гексафторфосфата O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония (8,86 г; 23,29 ммоль) и 5-(гидроксиметил)изоксазол-3-карбоновой кислоты (3,67 г; 25,62 ммоль) в безводном ДМФА (40 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и разбавляли этилацетатом, затем промывали водным раствором гидросульфата калия (1M) и водным раствором карбоната натрия (1M). Органический слой сушили сульфатом магния и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (элюируя от 0 до 10% метанола в дихлорметане) с получением 5,26 г (74%) N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этила)-5-(гидроксиметил)изоксазол-3-карбоксамид в виде липкого желтоватого твердого вещества.

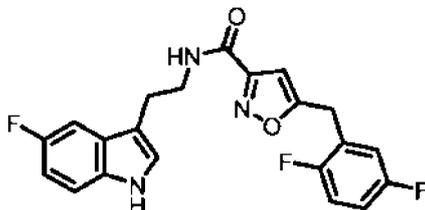
Промежуточное соединение VII - получение 5-(бромметил)-N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)изоксазол-3-карбоксамид.



Добавляли раствор N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)-5-(гидроксиметил)изоксазол-3-карбоксамид (5,30 г; 17,48 ммоль) в ТГФ (10 мл) к раствору пербромметана (8,69 г; 26,21 ммоль) и трифенилфосфина (6,88 г; 26,21 ммоль) в ТГФ (60 мл). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 2,5 ч. Твердое вещество отфильтровывали и раствор концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (элюируя от 15 до 100% этилацетата в гептане) с получением 2,64 г (41%) 5-(бромметил)-N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)изоксазол-3-карбоксамид в виде белого твердого вещества. ИЭР/АПСИ (+): 366, 368 (M+H). ИЭР/АПСИ (-): 366, 364 (M-H).

Получение соединений по изобретению

Пример 1. Получение 5-(2,5-дифторбензил)-N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)изоксазол-3-карбоксамид.

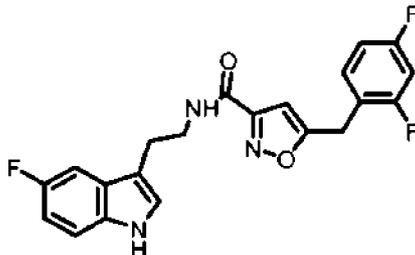


N-этилдиизопропиламин (25,65 мл; 148,37 ммоль) добавляли к перемешиваемой смеси гидрохлорида 2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этан-1-амин (13,00 г; 59,35 ммоль), 5-(2,5-дифторбензил)изоксазол-3-карбоновой кислоты (14,19 г; 59,35 ммоль) и гексафторфосфата O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония (22,57 г; 59,35 ммоль) в безводном ДМФА (90 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 60 ч и затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в этилацетате и раствор промывали водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле, используя градиент этилацетата (1-10%) в дихлорметане, с получением 20,02 г желтоватого твердого вещества, которое перекристаллизовывали из смеси дихлорметана и н-гептана, получая 19,06 г (80%) 5-(2,5-дифторбензил)-N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)изоксазол-3-

карбоксамид в виде белого твердого вещества. Или 5-(бромметил)-N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)изоксазол-3-карбоксамид (0,150 г; 0,409 ммоль) растворяли в DME (3 мл) и воде (1 мл) вместе с (2,5-дифторфенил)бороновой кислотой (0,068 г; 0,430 ммоль), карбонатом натрия (0,086 г; 0,430 ммоль), тетракис(трифенилфосфин)палладием (0) (0,024 г; 0,020 ммоль) и нагревали в течение ночи при 90°C. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь разбавляли водой и этилацетатом, органический слой сушили сульфатом магния и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (элюируя от 0 до 10% этилацетата в дихлорметане) с получением 0,038 г (23%) 5-(2,5-дифторбензил)-N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)изоксазол-3-карбоксамид в виде белого твердого вещества.

¹H ЯМР (DMCO-d₆) δ: 10,92 (уш. с, 1H), 8,82 (т, 1H), 7,1-7,38 (м, 6H), 6,90 (тд, 1H), 6,53 (с, 1H), 4,26 (с, 2H), 3,48 (кв., 2H), 2,88 (т, 2H). ИЭР/АРСИ (+): 400 (M+H). ИЭР/АРСИ (-): 398 (M-H).

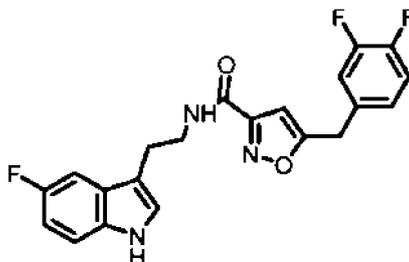
Пример 2. Получение 5-(2,4-дифторбензил)-N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)изоксазол-3-карбоксамид.



5-(Бромметил)-N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)изоксазол-3-карбоксамид (0,150 г; 0,409 ммоль) растворяли в DME (3 мл) и воде (1 мл) вместе с (2,4-дифторфенил)бороновой кислотой (0,068 г; 0,430 ммоль), карбонатом натрия (0,086 г; 0,430 ммоль), тетракис(трифенилфосфин)палладием (0) (0,024 г; 0,020 ммоль) и нагревали в течение ночи при 90°C. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь разбавляли водой и этилацетатом, органический слой сушили сульфатом магния и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (элюируя от 0 до 10% этилацетата в дихлорметане) с получением 0,0462 г (28%) 5-(2,4-дифторбензил)-N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)изоксазол-3-карбоксамид в виде белого твердого вещества.

¹H ЯМР (300 МГц, DMCO-d₆) δ: 10,92 (уш.с, 1H); 8,82 (т, 1H); 7,39-7,57 (м, 1H); 7,21-7,36 (м, 4H); 7,11 (тд, 1H); 6,90 (тд, 1H); 6,50 (с, 1H); 4,24 (с, 2H); 3,49 (кв, 2H); 2,89 (т, 2H). ИЭР/АРСИ (+): 400 (M+H). ИЭР/АРСИ (-): 398 (M-H).

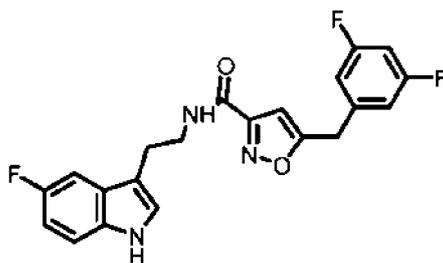
Пример 3. Получение 5-(3,4-дифторбензил)-N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)изоксазол-3-карбоксамид.



5-(Бромметил)-N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)изоксазол-3-карбоксамид (0,150 г; 0,409 ммоль) растворяли в DME (3 мл) и воде (1 мл) вместе с (3,4-дифторфенил)бороновой кислотой (0,068 г; 0,430 ммоль), карбонатом натрия (0,086 г; 0,430 ммоль), тетракис(трифенилфосфин)палладием (0) (0,024 г; 0,020 ммоль) и нагревали в течение ночи при 90°C. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь разбавляли водой и этилацетатом, органический слой сушили сульфатом магния и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (элюируя от 0 до 10% этилацетата в дихлорметане) с получением 0,065 г (40%) 5-(3,4-дифторбензил)-N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)изоксазол-3-карбоксамид в виде бледно-желтого твердого вещества.

¹H ЯМР (300 МГц, DMCO-d₆) δ: м.д. 10,92 (уш.с, 1H); 8,81 (т, 1H) 7,36-7,49 (м, 2H); 7,28-7,35 (м, 2H); 7,25 (д, 1H); 7,12-7,21 (м, 1H); 6,90 (тд, 1H); 6,54 (с, 1H); 4,23 (с, 2H); 3,48 (кв, 2H); 2,89 (т, 2H). ИЭР/АРСИ (+): 400 (M+H). ИЭР/АРСИ (-): 398 (M-H).

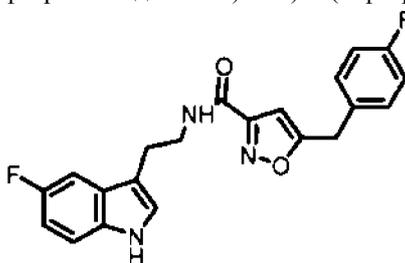
Пример 4. Получение 5-(3,5-дифторбензил)-N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)изоксазол-3-карбоксамид.



5-(Бромметил)-N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)изоксазол-3-карбоксамид (0,150 г; 0,409 ммоль) растворяли в DME (3 мл) и воде (1 мл) вместе с (3,5-дифторфенил)бороновой кислотой (0,068 г; 0,430 ммоль), карбонатом натрия (0,086 г; 0,430 ммоль), тетракис(трифенилфосфин)палладием (0) (0,024 г; 0,020 ммоль) и нагревали в течение ночи при 90°C. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь разбавляли водой и этилацетатом, органический слой сушили сульфатом магния и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (элюируя от 0 до 10% этилацетата в дихлорметане) с получением 0,068 г (41%) 5-(3,5-дифторбензил)-N-(2-(5-фторо-1H-индол-3-ил)этил)изоксазол-3-карбоксамида в виде белого твердого вещества.

¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д. 10,93 (уш.с, 1H); 8,83 (т, 1H); 7,03-7,42 (м, 6H); 6,91 (тд, 6 H); 6,59 (с, 1H); 4,27 (с, 2H); 3,50 (кв, 2H); 2,90 (т, 2H). ИЭР/АРСИ (+): 400 (M+H). ИЭР/АРСИ (-): 398 (M-H).

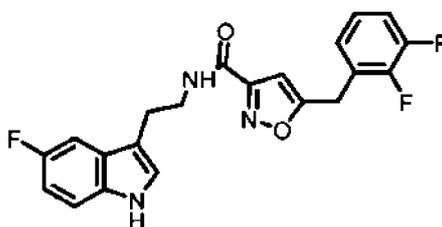
Пример 5. Получение N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)-5-(4-фторбензил)изоксазол-3-карбоксамида.



5-(Бромметил)-N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)изоксазол-3-карбоксамид (0,150 г; 0,409 ммоль) растворяли в DME (3 мл) и воде (1 мл) вместе с (4-фторфенил)бороновой кислотой (0,086 г; 0,430 ммоль), N,N-диизопропилэтиламино (0,151 мл; 0,819 ммоль), [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладием (11) (0,033 г; 0,040 ммоль) и нагревали в течение ночи при 90°C. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь разбавляли водой и этилацетатом, органический слой сушили сульфатом магния и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (элюируя от 0 до 10% этилацетата в дихлорметане) с получением 0,088 г (57%) N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)-5-(4-фторбензил)изоксазол-3-карбоксамида в виде белого твердого вещества.

¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д. 10,92 (уш.с, 1H); 8,80 (т, 1H); 7,11-7,42 (м; 7H); 6,81-6,99 (м, 1H); 6,51 (с, 1H); 4,21 (с, 2H); 3,48 (кв, 2H); 2,88 (т, 2H). ИЭР/АРСИ (+): 382 (M+H). ИЭР/АРСИ (-): 380 (M-H).

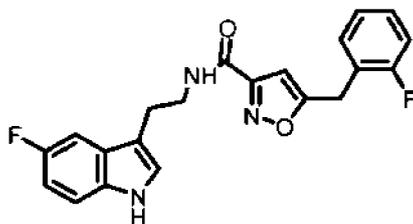
Пример 6. Получение 5-(2,3-дифторбензил)-N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)изоксазол-3-карбоксамида.



5-(Бромметил)-N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)изоксазол-3-карбоксамид (0,200 г; 0,546 ммоль) растворяли в DME (3 мл) и воде (1 мл) вместе с (2,3-дифторфенил)бороновой кислотой (0,129 г; 0,819 ммоль), N,N-диизопропилэтиламино (0,201 мл; 1,09 ммоль), бис(дифенилфосфино)ферроценом]дихлорпалладием (II) (0,045 г; 0,056 ммоль) и нагревали в течение ночи при 90°C. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь разбавляли водой и этилацетатом, органический слой сушили сульфатом магния и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенную смесь очищали флэш-хроматографией на силикагеле (элюируя от 20 до 100% этилацетата в гептане) с получением 0,015 г (7%) 5-(2,3-дифторбензил)-N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)изоксазол-3-карбоксамида в виде белого твердого вещества.

¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д. 10,85-11,04 (м, 1H); 8,82 (т, 1H); 7,45-7,30 (1H, м); 7,28-7,36 (м, 2H); 7,17-7,27 (м, 3H); 6,90 (тд, 1H); 6,55 (с; 1H); 4,33 (с; 2H); 3,48 (д, 2H); 2,88 (т, 2H). ИЭР/АРСИ (+): 400 (M+H). ИЭР/АРСИ (-): 398 (M-H).

Пример 7. Получение N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)-5-(2-фторбензил)изоксазол-3-карбоксамид.



5-(Бромметил)-N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)изоксазол-3-карбоксамид (0,150 г; 0,409 ммоль) растворяли в DME (3 мл) и воде (1 мл) вместе с (2-фторфенил)бороновой кислотой (0,086 г; 0,430 ммоль), N,N-диизопропилэтиламином (0,151 мл; 0,819 ммоль), бис(дифенилфосфино)ферроце-ном]дихлорпалладием (II) (0,033 г; 0,040 ммоль) и нагревали в течение ночи при 90°C. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь разбавляли водой и этилацетатом, органический слой сушили сульфатом магния и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенную смесь очищали флэш-хроматографией на силикагеле (элюируя от 0 до 10% этилацетата в дихлорметане) с получением 0,068 г (44%) N-(2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил)-5-(2-фторбензил)изоксазол-3-карбоксамид в виде белого твердого вещества.

¹H ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆) δ м.д. 10,93 (уш.с, 1H); 8,66-8,96 (м, 1H); 7,13-7,52 (м, 7H); 6,79-7,00 (м, 1H); 6,51 (с, 1H); 4,26 (с, 2H); 3,49 (кв, 2H); 2,89 (т, 2H). ИЭР/АПСИ (+): 382 (M+H). ИЭР/АПСИ (-): 380 (M-H).

Часть В.

Пример 8. Конструирование линии клеток со сверхэкспрессией гена TAU.

Экспрессирующую плазмиду TAU конструировали путем субклонирования кДНК человеческого TAU-P301L (кодирующей TAU с пролином 301, замещенным остатком лейцина) в вектор экспрессии pcDNA3.1 млекопитающих, в результате чего получали плазмиду pcDNA3.1-TAU P301L. Плазмиды pcDNA3.1 и pcDNA3.1-TAU P301L были трансфицированы в клетки нейробластомы человека (BM17; ATCC № CRL-2267), и были отобраны независимые клональные линии со стабильно интегрированными в геном плазмидами. В результате были получены клеточные линии, названные M17-3.1 и M17-TAU (P301L) (трансфицированные pcDNA3.1 и pcDNA3.1-TAU P301L соответственно). Экспрессия генов TAU P301L в клеточных линиях была подтверждена Вестерн-анализом.

Пример 9. Использование клеток, экспрессирующих P301L TAU, в качестве модели дегенерации нейронов.

Было обнаружено, что экспрессия TAU P301L в клетках M17-TAU (P301L) имеет повышенную токсичность по сравнению с контрольными клетками, экспрессирующими TAU дикого типа (M17-TAUwt).

В дегенерированных или мертвых клетках лактатдегидрогеназа (ЛДГ) просачивается из клеток во внеклеточную среду из-за потери целостности плазматической мембраны. Этот принцип был использован для определения цитотоксичности путем количественного определения уровня просочившейся ЛДГ в питательную среду по отношению к сумме общей активности ЛДГ из живых и мертвых клеток.

Подробная методика определения цитотоксичности была следующей.

Из соответствующих прекультур M17-3.1 и M17-TAU (P301L) клетки высевали при 2500 кл/см² в сыворотку с пониженным содержанием Optimem без фенолового красного (Gibco, Cat. 31985-047) с добавлением 1% эмбриональной сыворотки теленка, 1 мМ пирувата натрия, 1х незаменимых аминокислот, 500 мкг/мл G418 0,5х антибиотика/противогрибкового средства. После 3 ч инкубации при 37°C/5% CO₂ добавляли 1 объем сыворотки с пониженным содержанием Optimem (такая же, как описано выше; за исключением без сыворотки теленка), с 2,5 мкМ полностью транс-ретиноевой кислоты (АТРА). Клетки дополнительно инкубировали в течение 7 дней. Впоследствии активность ЛДГ определяли с использованием анализа нерадиоактивной цитотоксичности Promega Cytotox 96 (номер в каталоге G1780) в соответствии с инструкциями поставщика.

На фиг. 1А показано, что клетки M17-TAU P301L, но не клетки M17-3.1, имеют относительно высокий уровень ЛДГ, просочившегося в среду, демонстрируя токсичность, специально спровоцированную TAU P301. Подчеркивая чувствительность TAU(301) экспрессирующей клеточной линии нейробластомы, к дифференцировке, вызванной ретиноевой кислотой.

Пример 10. Использование клеток, экспрессирующих P301L TAU, в качестве модели для дисхомеостаза кальция.

Цистозный кальций измеряли путем загрузки клеток средой, содержащей Fura-2 AM (Sigma-Aldrich), проникаемого для клеток флуоресцентного зонда для Ca²⁺. Fura-2-AM растворяли в DMSO плюс 20% плюроновой кислоты (F-127) (Invitrogen) в соотношении 1:1 и разбавляли в среде до конечной концентрации 0,5 мкМ. К этой загрузочной среде добавляли пробенцид (Sigma-Aldrich) до конечной концентрации 2,5 мМ. Затем культуральную среду заменяли загрузочной средой и после инкубации в течение 1 ч при 37°C клетки дважды промывали и заменяли среду на HBSS (Gibco) с добавлением 0,2%

FBS и 0,02 М HEPES. Затем изменения в уровне цитозольного кальция измеряли с использованием считывающего устройства для микропланшетов FlexStation 3 (Molecular Devices) и определяли количественно ратиометрически, вычисляя изменения в количестве цитозольного Ca^{2+} , связанного с Fura-2 (интенсивность флуоресценции при 340 нм), относительно количества Ca^{2+} , несвязанного с Fura-2 (интенсивность флуоресценции при 380 нм). Данные обрабатывались в программном обеспечении SoftMax Pro 5.4.6 (Molecular Devices).

На фиг. 1В показано, что в P301L TAU экспрессирующих клетках, у которых токсичность индуцирована АТРА в соответствии со способом примера 9, обнаружены повышенные уровни цитозольного кальция.

Пример 11. Использование клеток, экспрессирующих P301L TAU, в качестве модели для нейродегенерации в скрининге соединений для лечения эпилепсии.

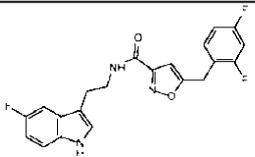
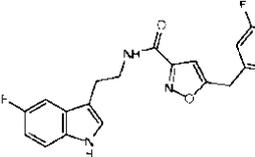
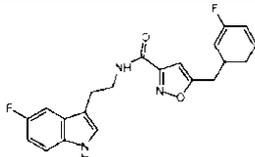
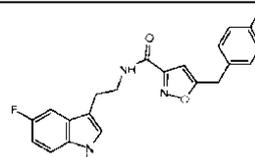
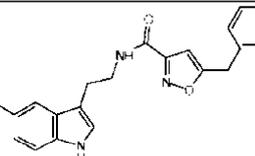
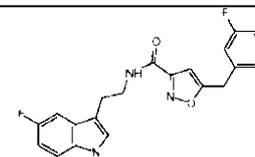
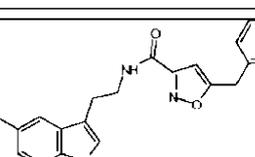
Модель клеточной линии с TAU-индуцированной цитотоксичностью позволяет идентифицировать соединения, которые можно использовать у трансгенных животных и людей для лечения эпилепсии. Исрадипин является ингибитором потенциал-управляемых кальциевых каналов (VGCC), хорошо известной мишенью для лечения эпилепсии, и исрадипин активен в моделях эпилепсии. На фиг. 2 показано снижение токсичности RA-инкубированных клеток, которые были обработаны исрадипином-ингибитором потенциал-управляемых кальциевых каналов (VGCC).

Пример 12. Использование клеток, экспрессирующих TAU, при скрининге примеров соединений по данному изобретению.

Клеточная линия M17-TAU P301L позволила оценить способность новых соединений противодействовать цитотоксичности TAU. Было обнаружено, что активные ингибиторы цитотоксичности TAU ингибируют утечку ЛДГ клеток M17-TAU P301L, обработанных, как описано в примере 9. Эффективность (активность) соединений определяли путем тестирования соединений в различных концентрациях в диапазоне от неэффективной (при относительно низкой концентрации) до эффективной концентрации по их способности снижать активность ЛДГ в инкубированных с ретиновой кислотой клетках M17-TAU P301L. Данные измерения были использованы для расчета значений EC_{50} .

Типичные соединения по данному изобретению показаны в табл. 1 с их химической структурой и их значением EC_{50} (выраженным в мкг/мл), как определено в примере 12, в эксперименте по TAU-индуцированной токсичности.

Таблица 1

Соединение	Структура	EC ₅₀ (мкг/мл)
1		0,0020
2		0,0020
3		0,0021
4		0,0022
5		0,0028
6		0,0034
7		0,0043

Кроме того, соединения были протестированы на снижение повышенного уровня цитозольного кальция. В присутствии соединений данные уровни цитозольного кальция снижались. На фиг. 3 показано, что соединения смягчают дисхомеостаз кальция в условиях токсичности в модели клеточной линии M17-TAU P301L, описанной в примере 9.

Пример 13. Ингибирование *ex-vivo* олигомерной амилоидной бета-токсичности.

Примерное соединение по данному изобретению было проверено на его способность ингибировать токсичность, вызванную олигомерным амилоидом бета (А β). Нейроны из эмбрионов крыс собирали и культивировали с использованием стандартных методов (таких как используемые в Schlager et al., 2014. Cell reports, 8(5), pp. 1248-56.). Дифференцированные нейроны были заражены А β и их жизнеспособность была определена количественно. Обработка А β привела к значительному снижению жизнеспособности нейронов, тогда как жизнеспособность была сильно восстановлена в нейронах, обработанных А β , в присутствии 100 нг/мл соединения 6 (фиг. 4). Эти результаты демонстрируют, что соединение 6 сильно уменьшает вызванную А β гибель нервных клеток.

Подробные методики.

В день *in vitro*, через 19 дней после выделения первичные нейроны гиппокампа трансфицировали Marcks-GFP для визуализации нейронов с помощью флуоресцентной микроскопии.

Подготовка ADDL для генерации A β o.

Получение ADDL (диффундирующих лигандов, полученных из Abeta) (представляющих A β o) было выполнено в соответствии с Klein (Klein, 2002). *Neurochemistry international*, 41(5), pp.345-52.). Abeta 1-42 приобретали у AnaSpec Inc. и растворяли в HFIP для гомогенизации пептида. Затем HFIP удаляли лиофилизацией и пленку Abeta сушили при -20°C в течение ночи над осушителем. Затем пленку Abeta повторно растворяли в 100% ДМСО и дополнительно разбавляли (1/25) в среде Хэма F12. Контроли готовили добавлением равных количеств ДМСО к среде Хэма F12. Растворы Abeta и контролей инкубировали в течение ночи при 4°C. Раствор центрифугировали при 14000×g в течение 10 мин при 4°C, супернатанты переносили в свежие пробирки и концентрацию белка определяли с помощью NanoDrop®.

Обработка клеток.

В день *in vitro* 21, первичные нейроны гиппокампа крыс обрабатывали равным объемом раствора контроля/ADDL, равным 0 и 1000 нМ ADDL. Культуры выдерживали при 37°C в 5% CO₂ в течение 24 ч до фиксации PFA. Жизнеспособность оценивали с использованием анализа "живые мертвые" из каталога Thermo Fisher, каталожный номер: L3224.

Фиксирование.

Нейроны фиксировали в 4% PFA/сахарозе в течение 10 мин при комнатной температуре.

Клетки пермебиализировали с использованием буфера, содержащего 0,1% Triton-X/0,1% NaCit/PBS. После промывания покровные стекла, содержащие нейроны, переворачивали на каплю монтажной среды (H1000, Vector Laboratories) (без DAPI), сушили при комнатной температуре и герметизировали.

Пример 14. Ингибирование активности VGCC *ex-vivo*.

Соединение 6 было проверено на его способность ингибировать активность VGCC в первичных нейронах. Нейроны из эмбрионов мышей собирали и культивировали с использованием стандартных методик (таких как используемые в Schlager et al., 2014. *Cell reports*, 8(5), pp. 1248-56). Чтобы стимулировать активность VGCC, нейроны деполяризовали с использованием 45 мМ KCl и инкубировали с носителем или соединением в концентрации 1,5 мкМ. Приток кальция измеряли с использованием флуоресцентного реагента Fura2 для определения уровня цитозольного Ca²⁺. На фиг. 5 показано, что в нейронах, обработанных соединением, приток Ca²⁺ после деполяризации KCl значительно снижался, что указывает на то, что соединение ингибирует активность VGCC.

Подробные методики.

Изменения в концентрации цитозольного Ca²⁺ измеряли после загрузки клеток Fura-2 AM (Sigma-Aldrich), проникаемым для клеток флуоресцентным зондом для Ca²⁺. Вкратце, Fura-2-AM растворяли в ДМСО с 20% плурононовой кислоты (F-127) (Invitrogen) в соотношении 1:1 и разбавляли в среде до конечной концентрации 0,5 мкМ. К этой загрузочной среде добавляли пробенецид (Sigma-Aldrich) до конечной концентрации 2,5 мМ. Затем культуральную среду заменяли загрузочной средой и после инкубации в течение 1 ч при 37°C клетки дважды промывали и заменяли среду на HBSS (Gibco) с добавлением 0,2% FBS и 0,02 М HEPES. Затем изменения в уровне цитозольного кальция измеряли с использованием считывающего устройства для микропланшетов FlexStation 3 (Molecular Devices) и определяли количественно ратиометрически, вычисляя изменения в количестве цитозольного Ca²⁺, связанного с Fura-2 (интенсивность флуоресценции при 340 нм), относительно количества Ca²⁺, не связанного с Fura-2 (интенсивность флуоресценции при 380 нм). Данные обрабатывались в программном обеспечении SoftMax Pro 5.4.6 (Molecular Devices).

Пример 15. Ингибирование патологий, вызванных TAU *in vivo*.

Трансгенным мышам APP * PS1 в возрасте 5 месяцев (*The Journal of Neuroscience*, September 1, 2000, 20(17):6452-6458) ежедневно подкожно вводили 20 мг/кг соединения 6 в течение 2 недель.

В конце периода введения мышей умерщвляли и соответствующие мозги использовали для биохимического анализа. Вестерн-анализ экстрактов головного мозга с использованием специфических к фосфо-TAU антител показал, что по сравнению с мышами, получавшими носитель, соединение 6 более эффективно снижало фосфорилирование TAU, демонстрируя *in vivo* эффект снижения количества патологических видов TAU в мозге соединением 6 (фиг. 6).

Пример 16. Влияние *in vivo* на когнитивные функции в мышинной модели болезни Альцгеймера.

Трансгенным мышам APP в возрасте 4 месяцев (*THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 274, No. 10, Issue of March 5, pp. 6483-6492, 1999) подкожно вводили соединение 6 в дозе 20 мг/кг, ежедневно в течение 8 недель. Когнитивные функции оценивали с помощью теста Морриса с водным лабиринтом. Во время фазы обучения, которая оценивает эффективность обучения, у мышей со временем уменьшился путь поиска по сравнению с мышами, получавшими носитель (фиг. 7, часть А). После фазы обучения было проведено испытание, в ходе которого платформа была извлечена из водяной бани, чтобы оценить пространственную память о местоположении платформы.

Данный тест выявил (фиг. 7, часть В) более высокий балл индекса пересечения кольца (который представляет собой количество плаваний через площадку платформы в целевой области, скорректированное с учетом плаваний через соответствующие области в других квадрантах), по сравнению с животными, получающими носитель.

Оба показателя указывают на то, что мыши, получавшие соединение, имели улучшенную когнитивную функцию, почти идентичную контрольной группе дикого типа, по сравнению с мышами, получавшими носитель.

Пример 17. Нормализация гиперактивации нейронов в ex-vivo мышинной модели болезни Альцгеймера.

Срезы мозга мышей дикого типа и tgAPP инкубировали с ДМСО или соединением 6.

Нейроны стимулировали с помощью возрастающих токов и измеряли частоту потенциалов действия (частота испускания импульсов).

У мышей tgAPP частота потенциалов действия при более высоких стимулах была выше. Инкубация срезов с примерным соединением 6 значительно снизила частоту по сравнению с диким типом (фиг. 8). Эти данные показывают, что у мышей tgAPP нейронная активность менее ограничена или не ограничена, как это наблюдается у мышей дикого типа, и что соединение снижает эту нейрональную гиперактивность у мышей tgAPP.

Острые срезы головного мозга.

Острые сагиттальные срезы головного мозга мышей ДТ или hAPP готовили обезглавливанием мышей после изофлурановой анестезии. Мозг быстро удаляли и погружали в течение 3-4 мин в ледяную свежеприготовленную режущую искусственную спинномозговую жидкость (жидкость для резки aCSF), содержащую (в mM) 214 сахарозы, 2,5 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgSO₄, 1,25 NaH₂PO₂, 26 NaHCO₃ и 10 глюкозы и насыщенную кислородом с отношением 95% O₂/5% CO₂. Сагиттальные срезы 350 мкм генерировали с использованием вибратора (VT 1000S; Leica Microsystems) и инкубировали в стандартной кислородсодержащей aCSF (в mM: 125 NaCl, 2,5 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgSO₄, 1,25 NaH₂PO₂, 26 NaHCO₃ и 10 глюкозы, осмолярность 305 мОсм) при 34°C в течение 20 мин. Инкубацию продолжали при комнатной температуре (к.т.) в течение еще 1 ч, после чего каждый срез переносили в погруженную камеру для записи и непрерывно перфузировали карбонизированной aCSF.

Запись фиксации потенциала одиночного действия CA1 (sAP) и частоты испускания импульсов.

Соматические или дендритные (>200 мкм от сомы) записи с фиксацией потенциала выполняли при комнатной температуре (от 24 до 28°C), и срезы непрерывно перфузировали карбоксилированной стандартной aCSF, дополненной контрольным или тестовым изделием REM0043039 при 2 мкМ. Для регистрации цельных клеток пипетки для фиксации потенциала заполняли раствором, содержащим (в mM) 140 K-глюконата, 5 NaCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 0,5 EGTA, 2 MgATP, 0,4 NaGTP, осмолярность 305, pH довели до 7,25 с помощью KOH. Сомы или дендрит крупных пирамидальных нейронов CA1 были идентифицированы и потенциал фиксированы после визуального приближения регистрирующей пипетки с использованием комбинации оптики инфракрасного света и дифференциального интерференционного контраста (DIC). Электроды фиксации потенциала имели сопротивление около 5 и 14 МΩ при заполнении для соматической и дендритной записи соответственно. Записи были прекращены, когда сопротивление серии превысило 40 МΩ. Сигналы были оцифрованы и отфильтрованы по нижним частотам при 10 кГц. Сигнал усиливался усилителем Axopatch 200B, оцифровывался с помощью интерфейса Digidata 155 и дискретизировался с помощью Clampex 10 (Molecular Devices, CA).

Одиночный спайк вызывали путем введения 2 мс деполяризующего импульса тока (35 пА), и параметры потенциала действия (AP) находились на исходном уровне и через 25 мин перфузии носителя или соединения.

Частота испускания импульсов дендритных клеток CA1 регистрировалась в ответ на гиперполяризационные и деполяризационные стадии (от -0,4 до +0,45 нА, шаги 0,05 нА) после 1-часовой перфузии носителем или соединением при 2 мкМ. Среднее количество потенциалов действия (частота испускания импульсов) было нанесено на график в зависимости от интенсивности текущего шага.

Пример 18. Испытания соединений в модели каинитовой эпилепсии.

Соединения были протестированы на крысиной модели каинитовой эпилепсии.

Фармакологическую оценку противоэпилептической активности соединений проводили на мышинной модели с использованием каиновой кислоты (КА) (Groticke et al., 2008, *Experimental Neurology*, 213, pp. 71-83; Dietrich et al., Aug 2016, *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, pp. 4005-4008). Данная модель показывает рецидивирующие судороги после начального КА-индуцированного эпилептического статуса (SE) и латентной эпилептогенной фазы от 2 до 3 недель.

КА вводили в область CA1 дорсального гиппокампа с последующей хирургической имплантацией ипсилатеральных биполярных электродов для записи ЭЭГ. Основываясь на появлении неконвульсивного SE, вызванного КА, мышей отбирали для включения в исследование. Видеомониторинг ЭЭГ один или два раза в неделю в течение 1 ч использовали для регистрации разрядов гиппокампа (HPD) с течением времени. Степень тяжести поведенческих (судорожных) судорог оценивали в соответствии с Racine (Racine RJ, 1972, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.*, 38(1):1-12).

Ежедневное подкожное введение соединения (25 мг/кг) или введение носителя начинали до или после первоначального, вызванного каинатом SE. У мышей, которым вводили соединение, наблюдалось снижение более чем на 20% вызванных каинатом HPD и/или спонтанных судорог по сравнению с мыша-

ми, которым вводили носитель.

Пример 19. Соединение увеличивает последующую гиперполяризацию потенциалов действия.

Улучшение тока калия А-типа имеет терапевтический потенциал для лечения эпилепсии, так как снижает возбудимость нейронов.

Были проанализированы потенциалы действия (AP) после электростимуляции срезов мозга мыши (фиг. 9). Последующая гипополяризация AP срезов, инкубированных с соединением 6, была увеличена, что указывает на то, что соединение облегчает реполяризацию нейронов до состояния покоя.

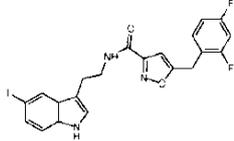
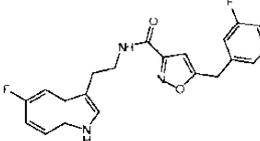
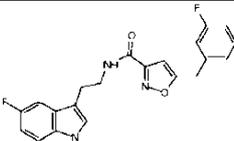
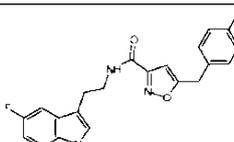
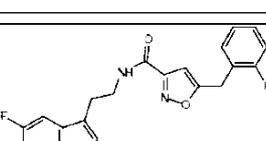
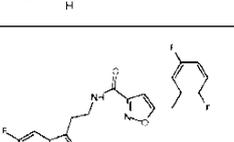
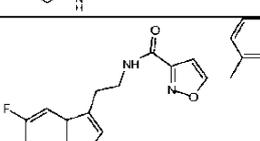
Эксперимент проводили, по существу, как описано в примере 17.

Пример 20. Использование модели дисомеостаза кальция с клетками, сверхэкспрессирующими TAU.P301L в скрининге соединений по данному изобретению.

Соединения тестировали на снижение повышенных уровней цитозольного Ca^{2+} в клеточной модели дисомеостаза кальция (фиг. 1B), как описано в примере 10. Эффективность (активность) соединений определяли путем тестирования соединений в различных концентрациях, в диапазоне от неэффективных до эффективных концентраций, на их способность снижать уровень цитозольного Ca^{2+} , связанного с Fura-2 (интенсивность флуоресценции при 340 нм) по отношению к количеству Ca^{2+} , несвязанного с Fura-2 (интенсивность флуоресценции при 380 нм).

Типичные соединения по данному изобретению представлены в табл. 2 с их химической структурой и значением EC_{50} , снижающим уровень цитозольного Ca^{2+} (выраженный в мкг/мл).

Таблица 2

Соединение	Структура	EC_{50} (мкг/мл)
1		0,0010
2		0,0014
3		0,0024
4		0,0035
5		0,0071
6		0,0024
7		0,0047

Пример 21. Использование ex-vivo модели индуцированного KCl притока кальция при скрининге соединений для лечения эпилепсии и других нейродегенеративных заболеваний, включающих дисомеостаз кальция.

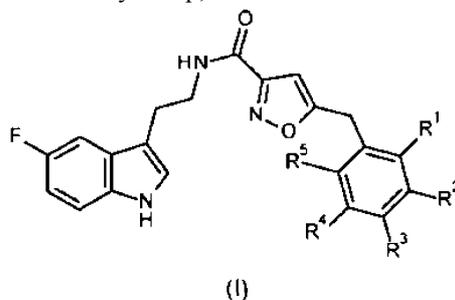
Соединения тестировали при 10 мкМ на их способность ингибировать приток Ca^{2+} в первичные нейроны (фиг. 5), как описано в примере 14. Первичные нейроны, обработанные носителем, в котором не было растворено соединение, использовали в качестве отрицательного контроля. Рассчитывали процент (%) ингибирования притока Ca^{2+} относительно нейронов, обработанных носителем. Результаты приведены в табл. 3.

Таблица 3

Соединение	(%) ингибирования цитозольного притока Ca^{2+}
1	43
2	48
3	42
4	39
5	42
6	43
7	56

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I) или его таутомер,



где

R^1 выбран из группы, состоящей из водорода и F;

R^2 выбран из группы, состоящей из водорода и F;

R^3 выбран из группы, состоящей из водорода и F;

R^4 выбран из группы, состоящей из водорода и F;

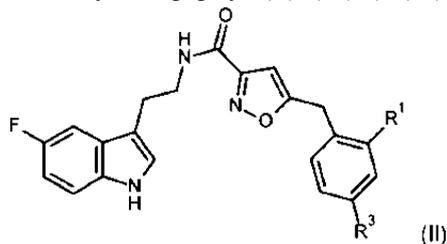
R^5 выбран из группы, состоящей из водорода и F;

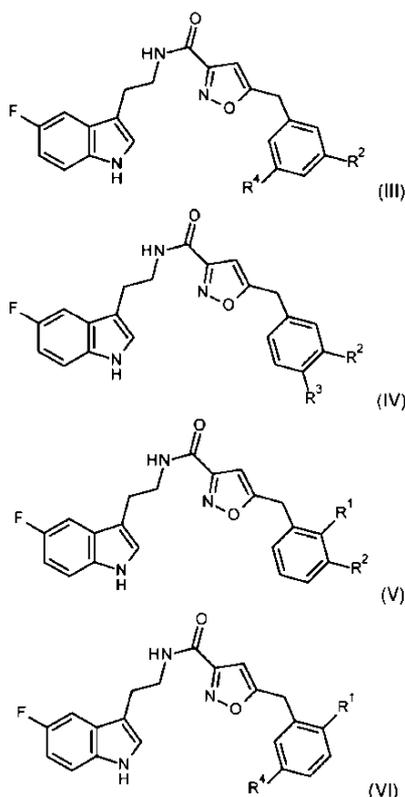
при условии, что по меньшей мере один из R^1 , R^2 , R^3 , R^4 или R^5 не является водородом;

при условии, что указанное соединение формулы (I) не является N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]-5-[(3-фторфенил)метил]изоксазол-3-карбоксамидом,

или фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1, имеющее любую из формул (II), (III), (IV), (V) или (VI)





где R^1 , R^2 , R^3 и R^4 имеют такие же значения, как определено в п.1.

3. Соединение по п.1 или 2, где R^2 , R^3 , R^4 и R^5 представляют собой водород, причем R^1 представляет собой F.

4. Соединение по п.1 или 2, где R^1 , R^2 , R^4 и R^5 представляют собой водород и R^3 представляет собой F.

5. Соединение по п.1 или 2, где R^2 , R^4 и R^5 представляют собой водород и R^1 и R^3 независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и F.

6. Соединение по п.1 или 2, где R^1 , R^4 и R^5 представляют собой водород и R^2 и R^3 независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и F.

7. Соединение по п.1 или 2, где R^1 , R^3 и R^5 представляют собой водород и R^2 и R^4 независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и F.

8. Соединение по п.1 или 2, где R^3 , R^4 и R^5 представляют собой водород и R^1 и R^2 независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и F.

9. Соединение по п.1 или 2, где R^2 , R^3 , и R^5 представляют собой водород и R^1 и R^4 независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и F.

10. Соединение по п.1, выбранное из группы, состоящей из

5-[(2,4-дифторфенил)метил]-N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]изоксазол-3-карбоксамида;

N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]-5-[(4-фторфенил)метил]изоксазол-3-карбоксамида;

5-[(2,3-дифторфенил)метил]-N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]изоксазол-3-карбоксамида;

5-[(2,5-дифторфенил)метил]-N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]изоксазол-3-карбоксамида;

N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]-5-[(2-фторфенил)метил]изоксазол-3-карбоксамида;

5-[(3,4-дифторфенил)метил]-N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]изоксазол-3-карбоксамида;

5-[(3,5-дифторфенил)метил]-N-[2-(5-фтор-1H-индол-3-ил)этил]изоксазол-3-карбоксамида.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая одно или более фармацевтических вспомогательных соединений и терапевтически эффективное количество соединения по любому из пп.1-10 и его фармацевтически приемлемой соли.

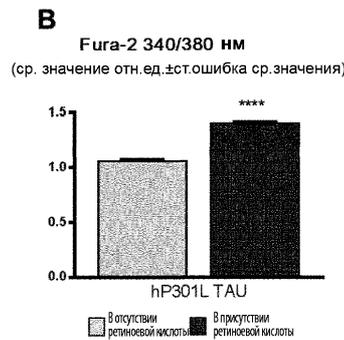
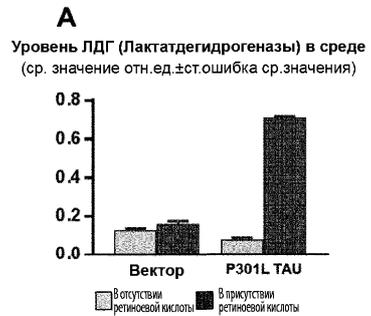
12. Применение соединения по любому из пп.1-10 или фармацевтической композиции по п.11 в качестве лекарственного средства.

13. Применение соединения по любому из пп.1-10 или фармацевтической композиции по п.11 в качестве лекарственного средства для профилактики и/или лечения эпилепсии, нейродегенеративных расстройств, болевых расстройств, тревожных расстройств, депрессии, биполярного расстройства, психоза, синдрома отмены лекарственного средства, табака, потери памяти, деменции, шизофрении и паники.

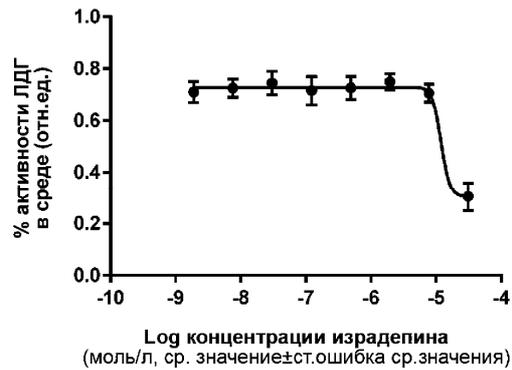
14. Применение по п.13, где эпилепсия выбрана из группы, состоящей из рефрактерной эпилепсии, синдрома Веста, синдрома Доуса, доброкачественной роландической эпилепсии, синдрома Расмуссена, синдрома Леннокса-Гасто, синдрома Стердж-Вебера, ювенильной миоклонической эпилепсии, абсансной эпилепсии у детей, эпилепсии, связанной с идиопатической локализацией, эпилепсии височной доли, парциальных судорог, простых парциальных судорог, тонических судорог, тонико-клонических судорог,

клонических судорог, миоклонических судорог, абсансных судорог и атонических судорог, эпилепсии лобной доли, эпилепсии с большими эпилептическими припадками, генерализованной эпилепсии, идиопатической эпилепсии, симптоматической эпилепсии и криптогенной эпилепсии.

15. Применение по п.13, где нейродегенеративное расстройство выбрано из группы, состоящей из болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, диффузной болезни телец Леви, бокового амиотрофического склероза, болезни Ниманна-Пика, синдрома Халлервордена-Шпатца, синдрома Дауна, нейроаксональной дистрофии, множественной системной атрофии, болезни Хантингтона, лобно-височной лобарной дегенерации (FTLD), цистического фиброза и болезни Крейтцфельда-Якоба.

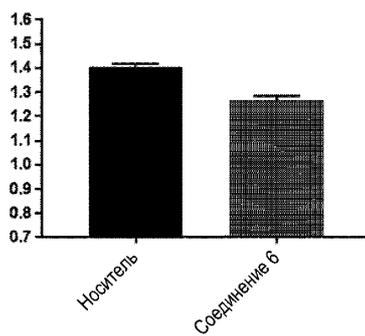


Фиг. 1



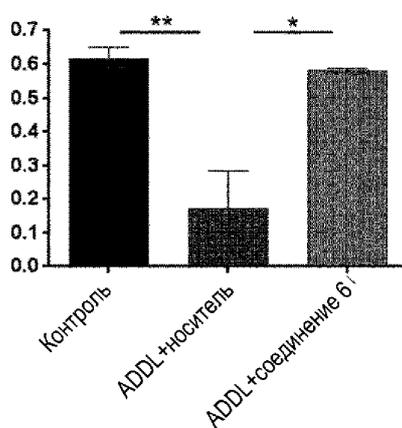
Фиг. 2

Fig-2 340/380 нм
(ср. значение±ст.ошибка ср.значения)



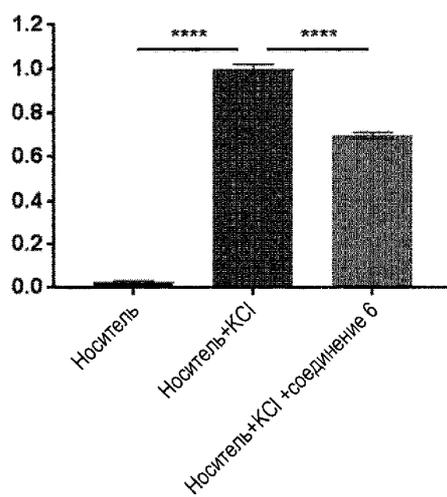
Фиг. 3

Жизнеспособные нейроны
(отн.ед.)

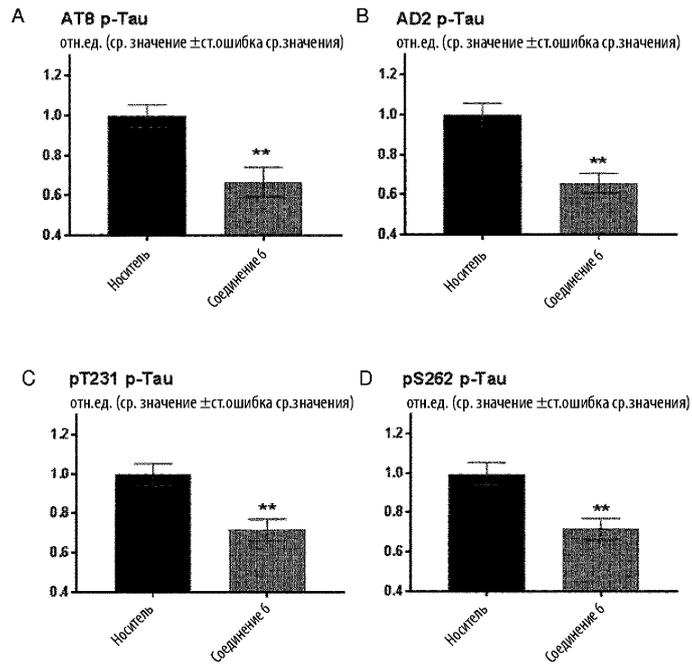


Фиг. 4

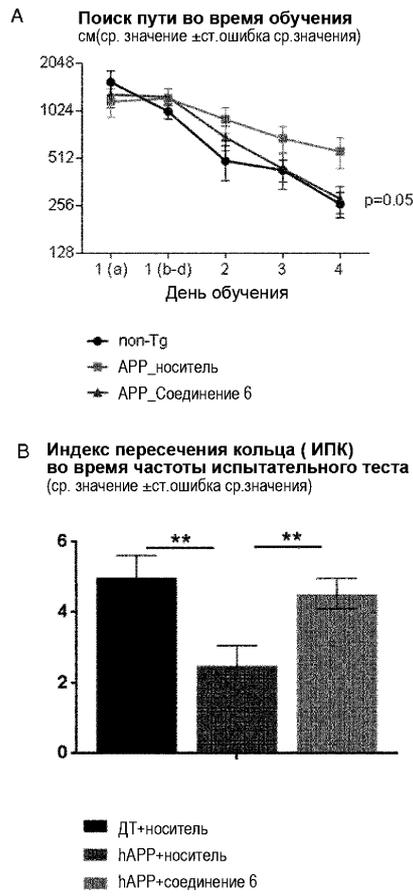
Цитозольный Ca²⁺
(отн.ед.)



Фиг. 5

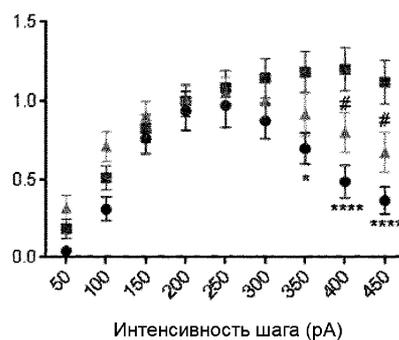


Фиг. 6



Фиг. 7

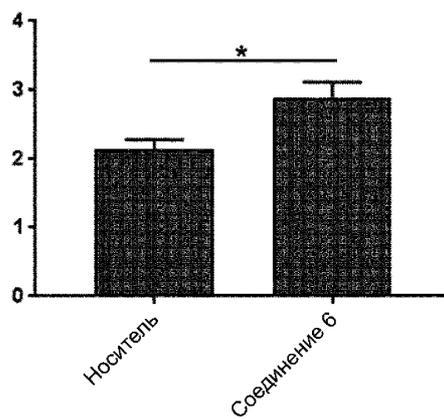
Частота испускания импульсов
(отн.ед.) (ср. значение \pm ст. ошибка ср. значения)



- DT (носитель)
- tgAPP (носитель)
- ▲ tgAPP (соединение 6)

Фиг. 8

АНР (амплитуда мВ)
(ср. значение \pm ст. ошибка ср. значения)



Фиг. 9

