

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291374** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.09.07

(51) Int. Cl. **A61K 31/5513** (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.18

**(54) ПРИМЕНЕНИЕ ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗОДИАЗЕПИНА И СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ
ТРАВМАТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

(31) **2019-0115**

(32) **2019.12.26**

(33) **CU**

(86) **PCT/CU2020/050009**

(87) **WO 2021/139842 2021.07.15**

(88) **2022.01.13**

(71) Заявитель:

**СЕНТРО ДЕ ИНВЕСТИГАЦИОН
И ДЕСАРРОЛЛО ДЕ
МЕДИКАМЕНТОС СИДЕМ (CU)**

(72) Изобретатель:

**Виейра Фуртадо Андресза Бонд, Алвес
Кортес Алине, Фарина Гонсалвес
Дебора, Дуарте Хартманн Диане,
Кассоль Густаво, Фрейре Ройес Луис
Фернандо, Антунес Соарес Феликс
Александр (BR), Нуньес Фигеро
Янье, Мондело Родригес Абель,
Падрон Иакус Алехандро Саул (CU)**

(74) Представитель:

Рыбина Н.А. (RU)

(57) Изобретение направлено на защиту нового применения JM-20, производного бензодиазепина, для лечения и восстановления после травматического повреждения головного мозга (ТБИ) и связанных с ним симптомов. Кроме того, предусмотрен способ лечения повреждения головного мозга, вызванного ТБИ.

202291374

A1

A1

202291374

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗОДИАЗЕПИНА И СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ТРАВМАТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА

ОПИСАНИЕ

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к области здравоохранения; в частности, к новому применению соединения JM-20, производного бензодиазепина. В настоящем изобретении конкретно предусмотрено применение JM-20 для лечения и восстановления после травматического повреждения головного мозга (ТБИ) и связанных с ним симптомов.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

ТБИ возникает, когда внешнее механическое воздействие вызывает дисфункцию головного мозга. ТБИ характеризуется внезапным физическим повреждением головного мозга. Это может быть вызвано несколькими факторами, в том числе войнами, террористическими действиями, автомобильными и другими дорожно-транспортными происшествиями, производственными травмами, спортивными травмами, насильственными преступлениями, бытовыми несчастными случаями, жестоким обращением с детьми и домашним насилием; или тупыми предметами, пронзившими череп, например, огнестрельными ранениями и т.д.

ТБИ является одной из ведущих причин смерти и инвалидности во всем мире. По оценкам, около 10 миллионов человек во всем мире страдают ТБИ. Поэтому поиск курса лечения, который предотвращает дальнейшие поражения после повреждения, имеет решающее значение (SHARMA D, VAVILALA MS. Perioperative management of adult traumatic brain injury. *Anesthesiology Clinics*. 30:333–46. 2012; HYDER, A.A. et al. The impact of traumatic brain injuries: a global perspective. *NeuroRehabilitation* 22(5):341–353. 2007). Чтобы обеспечить выздоровление, метаболизм должен быть нормализован как можно скорее после травмы, чтобы предотвратить последующую функциональную недостаточность (KRISHNA, G. et al. 7,8 dihydroxyflavone facilitates the action exercise to restore plasticity and functionality: Implications for early brain trauma recovery. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. (6):1204-1213. 2017).

Физические, поведенческие и/или психические изменения в результате ТБИ будут зависеть от области, которая была поражена. Повреждения включают в себя очаговое и диффузное поражение головного мозга. Очаговое поражение ограничивается небольшим участком головного мозга. Очаговое поражение чаще возникает на месте попадания в голову тупого предмета или предмета, похожего на пулю, вошедшего в мозг. Диффузное поражение распространяется по всему головному мозгу. Несмотря на то, что за

последние несколько десятилетий неотложная помощь при черепно-мозговых травмах значительно улучшилась, стойкие последствия, такие как инвалидность, по-прежнему вероятны после умеренного и тяжелого TBI. В настоящее время известно, что при TBI первичное повреждение запускает процесс вторичного повреждения головного мозга в последующие часы и дни.

Следовательно, можно сказать, что два важных патофизиологических процесса способствуют повреждению головного мозга после травмы, т.е. первичное повреждение, при котором поражение является прямым результатом механического воздействия, и вторичное повреждение, которое возникает сразу после травмы из-за новых клеточных повреждений, возникающее в результате последствий первичных повреждений, которые развиваются в течение нескольких часов и дней после первоначального повреждения (MAAS, A. I., STOCCHETTI, N. AND BULLOCK, R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *The Lancet Neurology*, 7, 728-741. 2008). Во время этой второй фазы основной известный механизм патогенеза повреждения клеток в основном активируется высвобождением нейротрансмиттеров, гомеостазом кальция, окислительным стрессом, воспалением и проникновением через гематоэнцефалический барьер (ANGELONI, C. et al. Traumatic brain injury and NADPH oxidase: a deep relationship. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 370312. 2015).

По диагностическим критериям TBI имеет одну или несколько из следующих характеристик: изменение уровня сознания; ухудшение памяти; спутанность сознания, связанная с дезориентацией; неврологические признаки, такие как повреждения головного мозга, которые можно увидеть при нейровизуализации, новые или усугубившиеся судорожные припадки, дефицит поля зрения и гемипарез. Хотя некоторые симптомы могут появиться сразу после повреждения, другие могут развиваться со временем в соответствии с анатомическими изменениями, произошедшими в нижележащих слоях нервной ткани после повреждения.

Выжившие после TBI могут испытывать широкий спектр нарушений. Снижение сенсомоторных и когнитивных функций также являются одними из распространенных последствий этих повреждений. Снижение сенсомоторных функций включает в себя элементы пареза, постурального дисбаланса/нарушения равновесия и походки, а также нарушения ранней реакции вздрагивания (SR). TBI может вызвать брадикинезию, аномалии колебаний и ухудшение времени реакции. Раннее нарушение равновесия является прогностическим фактором неблагоприятного прогноза после TBI. Сенсомоторные проблемы могут улучшиться со временем; хотя серьезная недостаточность может сохраняться в течение первых 1-2 лет после травмы. В когнитивной сфере могут быть нарушения памяти, дефицит внимания и замедление скорости обработки информации. Более тяжелое TBI вызывает большую и более

продолжительную недостаточность, чем легкое или умеренное TBI. В настоящее время не существует соответствующих курсов лечения для предотвращения долгосрочных последствий TBI.

Первичная фаза TBI описывает непосредственное повреждение ткани головного мозга из-за ушибов или гипоксии, вызванных синдромом объемного образования в полости черепа. Первичные повреждения при TBI можно уменьшить только за счет более эффективной профилактики. Вторичные повреждения возникают после травмы и лежат в основе функциональной недостаточности, связанного с TBI. Они возникают позже из-за таких механизмов, как реперфузионное повреждение, поздний отек коры, нарушение гематоэнцефалического барьера, глутаматергический шторм и локальный электролитный дисбаланс. Эти изменения сами по себе могут вызывать ROS-опосредованную нейродегенерацию за счет высвобождения кальция, токсичности глутамата, перекисного окисления липидов и митохондриальной дисфункции. Упомянутое вторичное повреждение может произойти рядом с участком головного мозга предполагаемого первичного повреждения, что повышает вероятность неожиданного распространения поврежденного участка в последующие месяцы.

Ключевые факторы, способствующие этому второму каскаду поражения головного мозга, включают в себя: возбуждающие аминокислоты, такие как глутамат, гомеостаз Ca^{++} и активные формы кислорода (ROS) (Kluger et al. 2004, Gaetz et al. 2004). Митохондрии являются одними из клеточных органелл, пораженных вторичными повреждениями головного мозга, в частности потенциальный коллапс митохондриальной мембраны (D i), по-видимому, играет центральную роль среди факторов, ведущих к гибели клеток головного мозга из-за вторичных повреждений головного мозга и нейродегенеративных заболеваний (Kluger et al. al. 2004; Gaetz et al.2004).

В настоящее время TBI считается неудовлетворенной медицинской потребностью. Поэтому разработка эффективных лечебных мероприятий для защиты головного мозга и содействия восстановлению после травматического повреждения головного мозга является особенно актуальной задачей.

JM-20 (3-этоксикарбонил-2-метил-4-(2-нитрофенил)-4,11-дигидро-1H-пиридол[2,3-b][1,5]-бензодиазепин), его производные и содержащие его фармацевтические соединения получили защиту для специфического лечения нейродегенеративных расстройств, сопровождающихся снижением когнитивных функций, болезни Паркинсона и невропатической боли, связанных со старением, в соответствии с международной патентной публикацией WO/2017/190713. Однако предварительных исследований с использованием JM-20 в качестве терапии TBI не проводилось. Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что JM-20 оказывает полезное действие при лечении TBI.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к применению JM-20 для уменьшения и/или устранения неблагоприятных эффектов TBI. В частности, это помогает увеличить скорость восстановления пациентов после TBI, включая в себя восстановление их сенсомоторных, когнитивных функций и пространственной памяти.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения для уменьшения и/или обратного развития TBI путем введения пациентам терапевтически эффективной дозы JM-20 для устранения поведенческих, морфологических и биохимических изменений.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1. Влияние TBI и лечения с помощью JM-20 на латентность падения во время теста с вращающимся стержнем.

Фигура 2. Влияние TBI и лечения с помощью JM-20 на события пересечения во время теста открытого поля.

Фигура 3. Влияние TBI и лечения с помощью JM-20 на события вертикальной двигательной активности во время теста открытого поля.

Фигура 4. Влияние TBI и лечения с помощью JM-20 на время неподвижности во время теста открытого поля.

Фигура 5. Влияние TBI и лечения с помощью JM-20 на время завершения теста с ходьбой по сужающейся дорожке.

Фигура 6. Влияние TBI и лечения с помощью JM-20 на содержание воды в головном мозге.

Фигура 7. Влияние TBI и лечения с помощью JM-20 на экспрессию p-Akt в коре головного мозга с помощью вестерн-блоттинга.

Фигура 8. Влияние TBI и лечения с помощью JM-20 на экспрессию p-Akt в гиппокампе с помощью вестерн-блоттинга.

Фигура 9. Влияние TBI и лечения с помощью JM-20 на экспрессию iBa-1 в коре головного мозга с помощью вестерн-блоттинга.

Фигура 10. Влияние TBI и лечения с помощью JM-20 на экспрессию iBa-1 в гиппокампе с помощью вестерн-блоттинга.

Фигура 11. Влияние TBI и лечения с помощью JM-20 на экспрессию GFAP в коре головного мозга с помощью вестерн-блоттинга.

Фигура 12. Влияние TBI и лечения с помощью JM-20 на экспрессию GFAP в гиппокампе с помощью вестерн-блоттинга.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что применение соединения JM20 обладает биологической активностью при лечении TBI.

При оценке влияния введения JM-20 на следующие параметры в моделях с использованием животных после TBI, а именно: двигательную активность; отек мозга; реактивность астроцитов; активацию микроглии; и активацию путей выживания, оно оказалось эффективным в снижении, а в некоторых случаях и в обратном развитии побочных эффектов TBI, включая в себя поведенческие, морфологические и биохимические изменения.

В ходе поведенческих тестов было отмечено, что у животных, перенесших TBI, наблюдалось снижение латентного времени первого падения в тесте с вращающимся стержнем по сравнению с другими группами ($p < 0,05$). На фигуре 1 значения представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 8-11$, на группу), где (*) — различия между контролем, группами JM-20 и TBI + JM-20, $p < 0,05$ (согласно критерию Краскела - Уоллиса, после которого проводили апостериорный критерий Данна).

Также у них было меньшее количество переходов и большее время неподвижности в тесте открытого поля по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$ и $p < 0,01$). На фигуре 2 значения выражены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 8-11$, на группу), где (*) — различия контрольных групп, $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием Тьюки). В то время как на фигуре 3 данные представлены как среднее $\pm$ SEM ($n = 8-11$, на группу), где (*) — различия между контролем и группой TBI + JM-20, $p < 0,05$ (согласно однофакторному дисперсионному анализу с последующим апостериорным критерием Тьюки). Кроме того, наблюдалось большее количество событий вертикальной двигательной активности по сравнению с контролем и группой TBI + JM-20 ($p < 0,05$). На фигуре 4 данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 8-11$, на группу). (**) Отличается от контроля, $p < 0,01$ (однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием Тьюки).

В тесте с ходьбой по сужающейся дорожке крысам в группе TBI требовалось больше времени для прохождения курса, чем в контрольной группе и группе JM-20 ($p < 0,05$). На фигуре 5 данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 6$, на группу). (*) Отличается от контроля и группы JM20, $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием Тьюки).

Содержание воды в головном мозге увеличилось в группе TBI по сравнению с контролем и группами TBI + JM-20 ($p < 0,05$). На фигуре 6 данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 6$). (*) Отличается от контроля, #

отличается от группы TBI $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием Тьюки).

При вестерн-блоттинге экспрессия p-Akt снижалась в группах TBI как в коре головного мозга, так и в гиппокампе по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$), а также в гиппокампе по сравнению с контрольной группой и группой TBI + JM-20. ($p < 0,05$). На фигуре 7 данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 6$). (*) Отличается от контроля, $p < 0,05$ (однонаправленный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием Тьюки). В то время как на фигуре 8 данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 6$). (*) Отличается от контроля, $p < 0,05$; # отличается от TBI, $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием Бонферрони).

Экспрессия iba-1 повышалась в группах TBI как в коре головного мозга по сравнению со всеми заболеваниями ($p < 0,01$), так и в гиппокампе по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$). На фигуре 9 данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 6$). (**) Отличается от контроля, JM-20 и JM-20 + JM-20 $p < 0,01$ (однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием Ньюмена-Кейлса). В то время как в фигуре 10 данных представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 6$). (**) Отличается от контроля, $p < 0,01$ (однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием Тьюки).

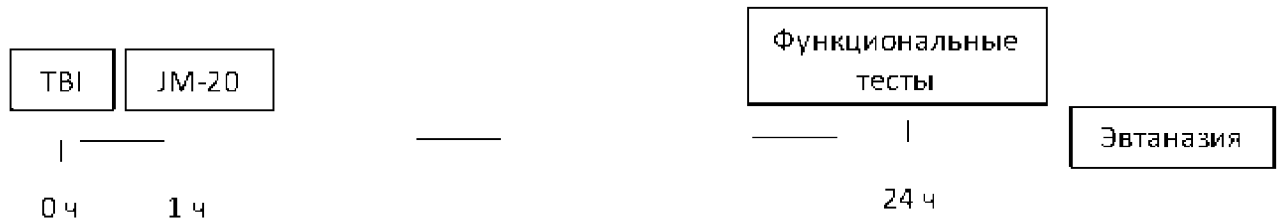
Экспрессия GFAP не показала изменений ни в одной из групп. Как на фигуре 11, так и на фигуре 12 данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 6$).

ПРИМЕРЫ

Животные

Использовали самцов крыс Wistar (200-250 г) со средним возрастом 60 дней, которых содержали в определенных условиях в боксах с кормом и водой по желанию. Процедуры проводили в соответствии с правилами Комитета по этике и благополучию животных UFSM (9426190418).

Схема эксперимента



Индукция TBI

Функциональные тесты

TBI индуцировали с помощью модели падающего груза (MANNIX, R. et al. Chronic Gliosis and Behavioral Deficits in Mice Following Repetitive Mild Traumatic Brain Injury. Journal of Neurosurgery. 2014). Использовали гирию массой 54 г, сбрасываемую с высоты 100 см и свободно падающую на голову животного. Животных подвешивали на алюминиевой фольге с небольшими надрезами, чтобы гарантировать, что она сломается от удара веса, допускающего внезапное ускорение движения, что приведет к разрыву алюминиевой фольги и падению на губку. Животных с индуцированным TBI предварительно анестезировали 2% изофлураном. Кроме того, на голову животных наносили лидокаин для минимизации посттравматической боли (MYCHASIUK, R. et al. A Novel Model of Mild Traumatic Brain Injury for Juvenile Rats. Journal of Visualized Experiments. 2014).

Эвтаназия

Животных обезглавливали с помощью ножниц, сразу же извлекали их мозг и иссекали гиппокамп и кору.

Функциональные тесты

Вращающийся стержень

Животных обучали в течение 5 минут перед TBI, чтобы они могли адаптироваться к аппарату. Сеанс тестирования состоял из 5 попыток и завершался при падении животных с ротора (диаметр 3,7 см, скорость 25-30 об/мин) или по истечении времени отсечки, т.е. 300 с. (Whishaw et al., 2003). Анализируют латентность первого падения.

Тест открытого поля

Животных помещали в центральную часть открытого поля (диаметром 56 см), поверхность которого была разделена на равные части. Продолжительность теста составила 300 секунд. Анализировали количество обходов животных по квадрантам, количество их исследовательских реакций (события вертикальной двигательной активности) и время их неподвижности.

Тест с ходьбой по сужающейся дорожке

Тест с ходьбой по сужающейся дорожке (HAUSSER, N. et al. Detecting Behavioral Deficits in Rats After Traumatic Brain Injury. *J. Vis. Exp.* (131), e56044, doi:10.3791/56044. 2018.) заключается в том, что животные ходят по подвесной деревянной балке (шириной 2,5 см и длиной 100 см), чтобы добраться до черного деревянного ящика, расположенного в конце аппарата. Сначала крыс помещали в деревянный ящик на одну минуту для акклиматизации. Вскоре после этого их поместили на другой конец и предложили пройти по балке, чтобы добраться до противоположного конца. Проанализировали три попытки. Крыс обучали перед TBI для ознакомления с аппаратом. В день проведения теста фиксировали время каждой попытки и усредняли их значения.

Отек головного мозга

Отек головного мозга определяли путем измерения содержания воды в головном мозге с использованием влажно-сухого метода, описанного Chen et al (2014) (CHEN, W. et al. Neuroprotective effect of allicin against traumatic brain injury via Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway-mediated anti-inflammatory and anti-oxidative activities. *Neurochemistry International*. 68:28-37. 2014). Через двадцать четыре часа после TBI животных умерщвляли, их мозг быстро извлекали и взвешивали для определения их массы во влажном состоянии. Затем сушили в печи при 100°C в течение 48 часов, после чего ткани снова взвешивали до полного высыхания. Содержание воды в головном мозге рассчитывали по следующей формуле:

$$\% \text{ H}_2\text{O} = (1 - \text{масса в сухом состоянии} / \text{масса во влажном состоянии})$$

Вестерн-блоттинг

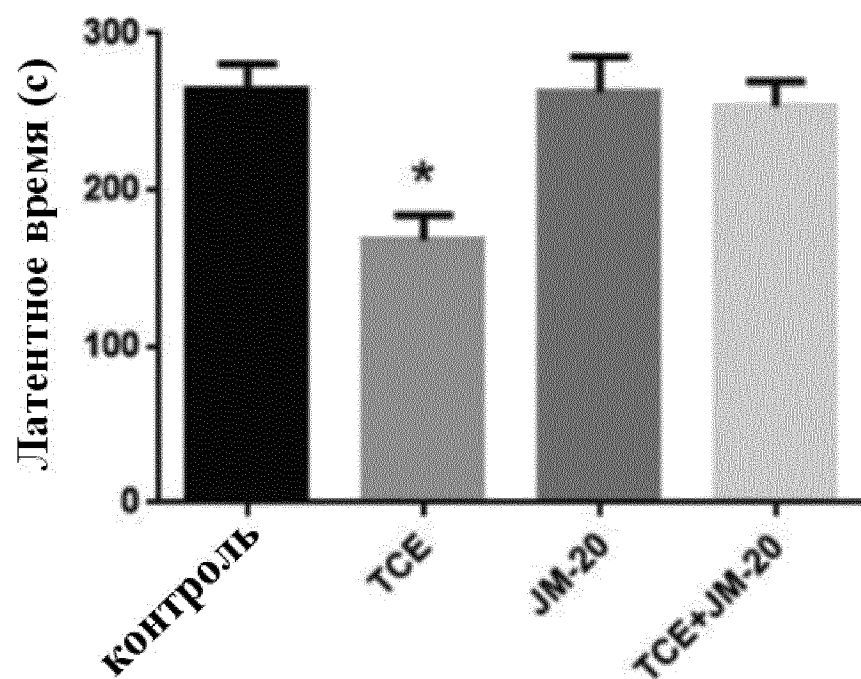
Вестерн-блоттинг проводили в соответствии с Gerbatin et al (2017) с некоторыми корректировками (GERBATIN, R.D.R. et al. Guanosine Protects Against Traumatic Brain Injury-Induced Functional Impairments and Neuronal Loss by Modulating Excitotoxicity, Mitochondrial Dysfunction, and Inflammation. *Molecular Neurobiology*. 54(10):7585-7596. 2017.). Образцы ткани гиппокампа и коры головного мозга лизировали в RIPA (анализ радиоиммунопреципитации) и центрифугировали в течение 20 минут при 12700×g и 4°C. Концентрацию белка в каждом образце определяли с помощью анализа белка на основе бигинхониновой кислоты (Thermo Fisher Scientific). Образцы (30 мкг белка) подвергали электрофорезу в SDS-полиакриламидном геле при 4-12% и переносили на нитроцеллюлозную мембрану с помощью системы переноса Trans-Blot® Turbo™, а белковую нагрузку подтверждали раствором Ponceau S (Sigma Aldrich - P7170). После специфической блокады переносы инкубировали в течение одной ночи при 4°C с одним кроличьим антителом к ионизированной молекуле адаптера связывания кальция Iba-1

(1:400; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.), кроличьим антителом к глиальному фибриллярному кислому белком (GFAP) (1:1000; Dako), Phospho-Akt (1:1000; Cell signaling).

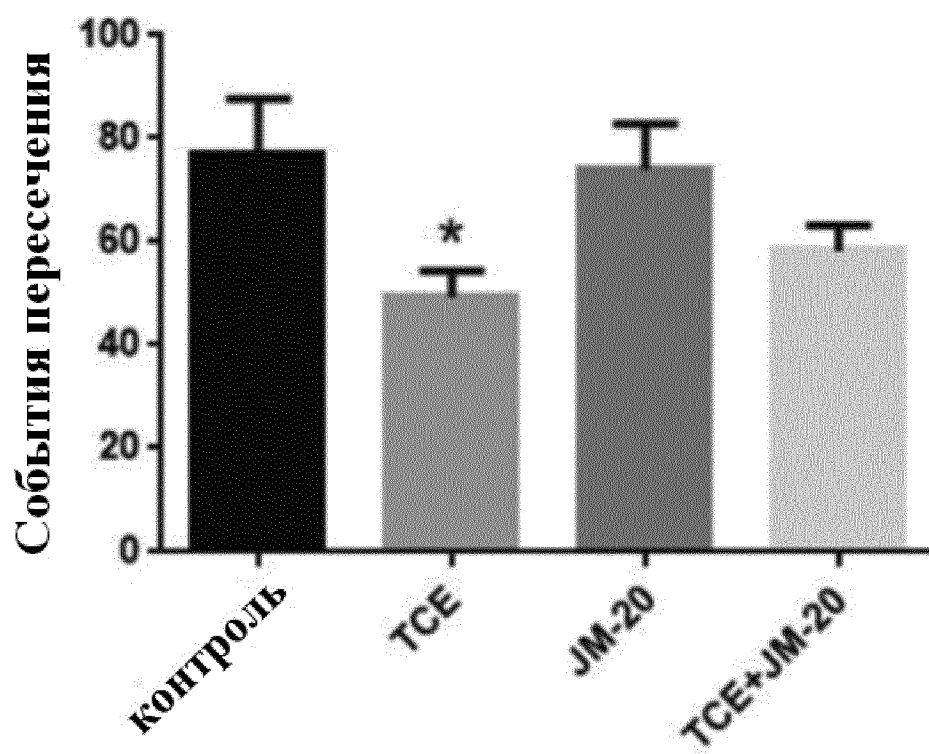
Мышиное антитело к β -актину (1:10000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.) окрашивали в качестве дополнительного контроля белковой нагрузки. После инкубации с первичным антителом мембраны дважды промывали в TBS-T (TBS + Tween 20, 0,1%) при комнатной температуре в течение 10 минут и инкубировали со вторичными антителами к антителам кролика (Sigma Aldrich-A6154) или антителам мышей (Santa Cruz Biotechnology - sc -2005), конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (1:5000), в течение двух часов при комнатной температуре. Полосы визуализировали с помощью усиленной хемилюминесценции с использованием субстрата для ECL Western Blotting (Pierce ECL, BioRad) и регистрировали сигналы с помощью системы фотодокументирования ChemiDoc XRS + (BioRad). Затем полосы количественно определяли с использованием программного обеспечения Image Lab (Bio-Rad).

ОПУБЛИКОВАННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

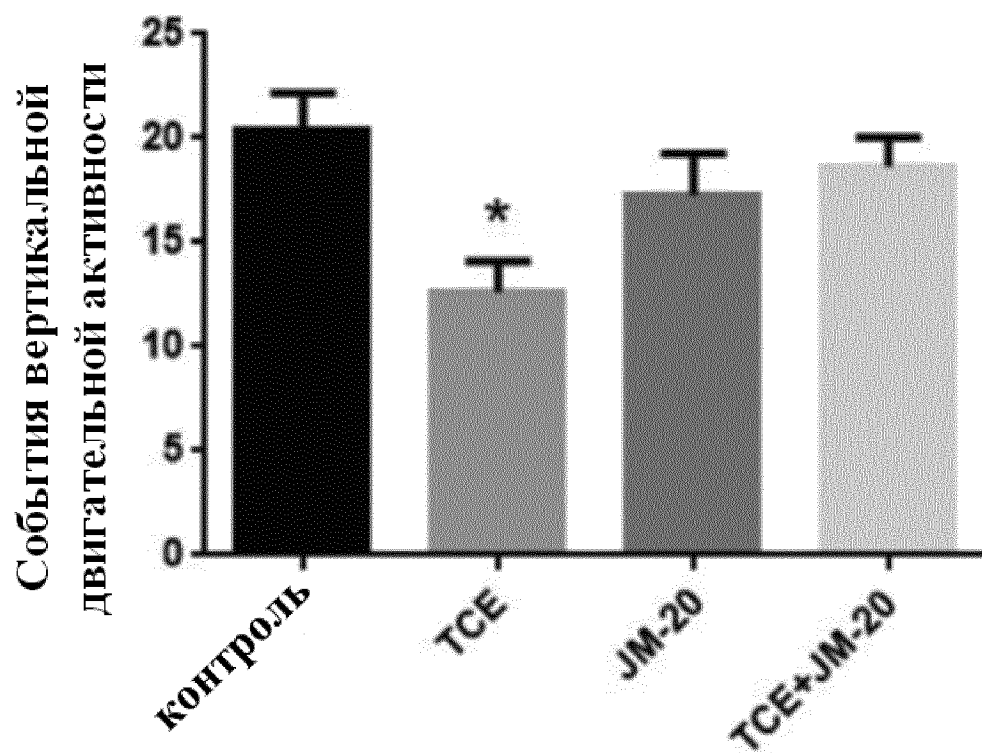
1. Применение соединения JM20 при лечении травматического повреждения головного мозга (TBI).
2. Соединение по п. 1, где лечение улучшает скорость восстановления пациентов после TBI.
3. Соединение по п. 1, где лечение улучшает восстановление сенсомоторных функций пациентов после TBI.
4. Соединение по п. 1, где лечение улучшает восстановление когнитивных функций пациентов после TBI.
5. Соединение по п. 1, где лечение улучшает пространственную память пациентов после TBI.
6. Способ лечения для уменьшения и/или обратного развития TBI у пациентов, включающий в себя введение им терапевтически эффективной дозы JM20.
7. Способ лечения, описанный выше в п. 6, где лечение является эффективным для снижения и/или обратного развития поведенческих, морфологических и биохимических изменений.



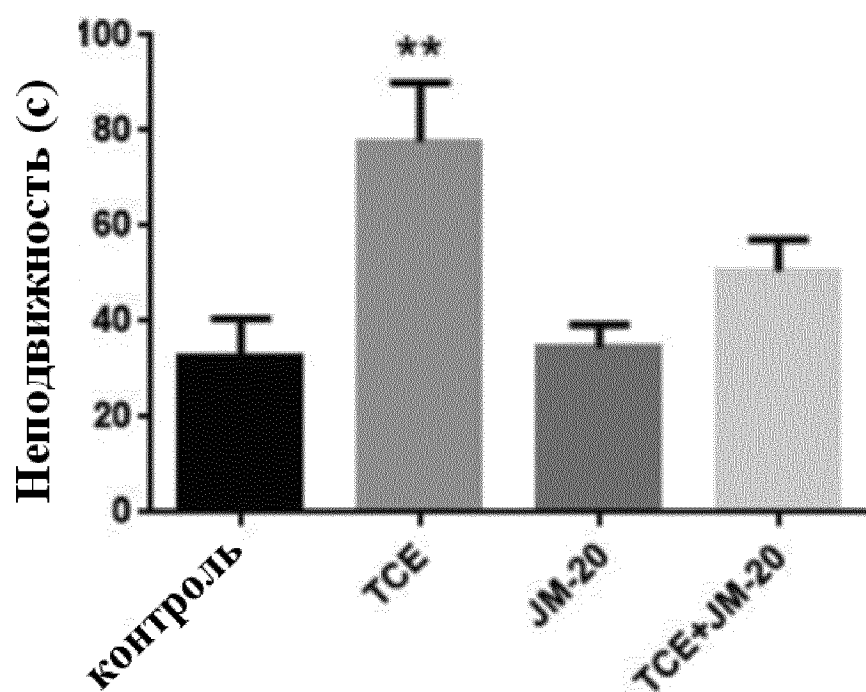
ФИГУРА 1



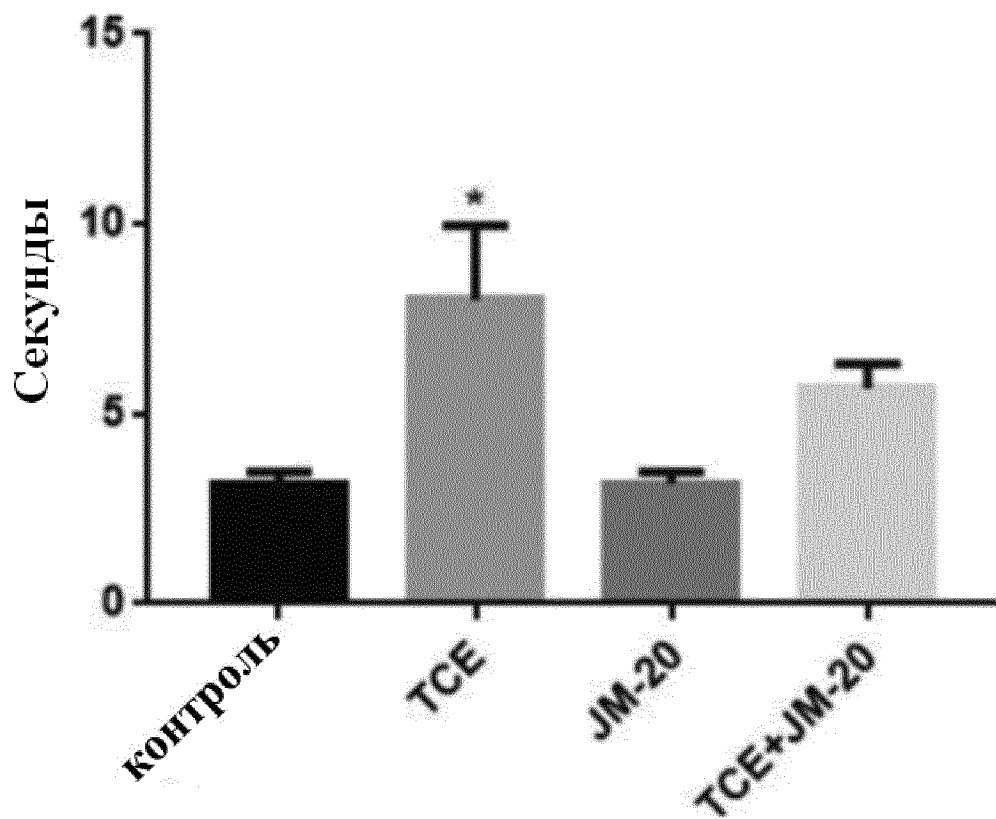
ФИГУРА 2



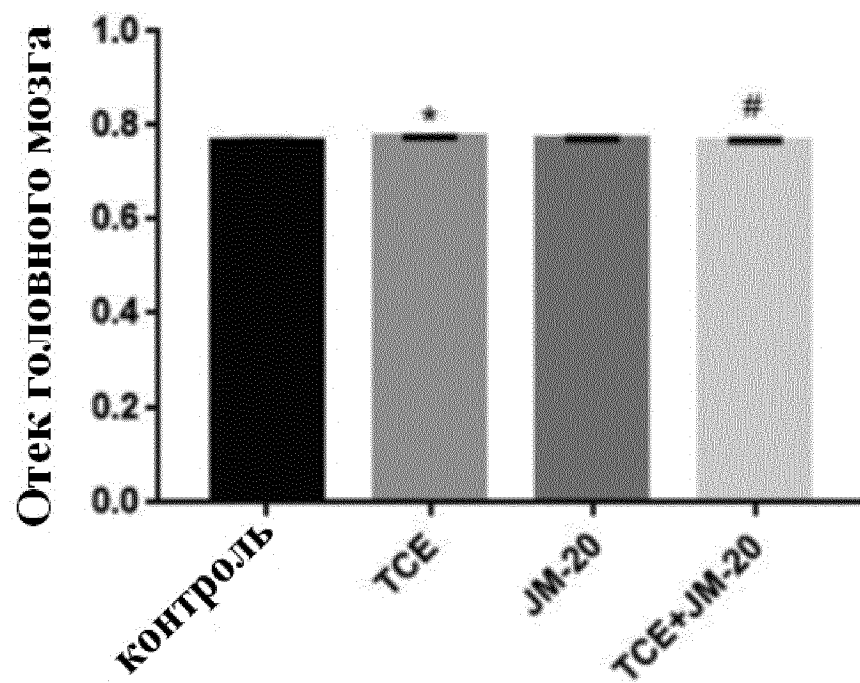
ФИГУРА 3



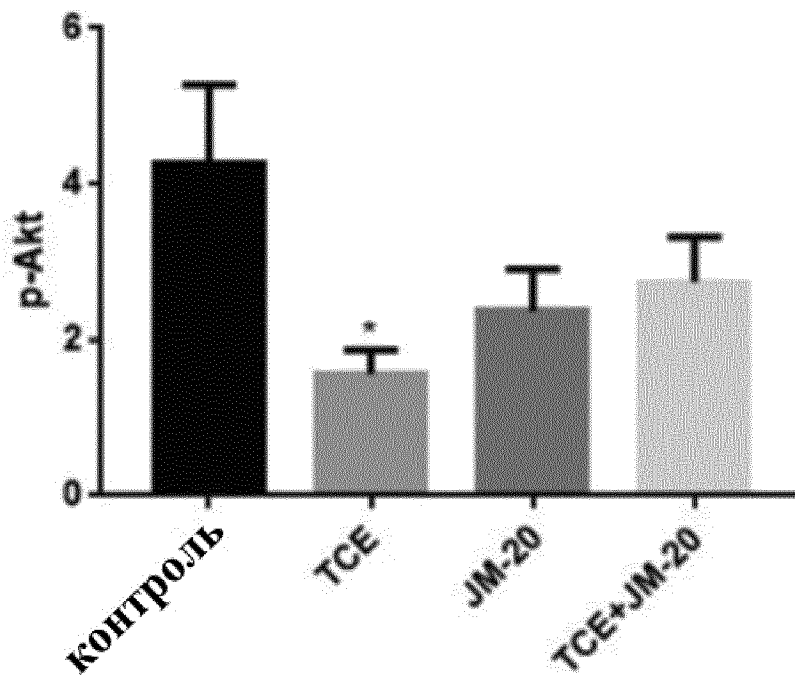
ФИГУРА 4



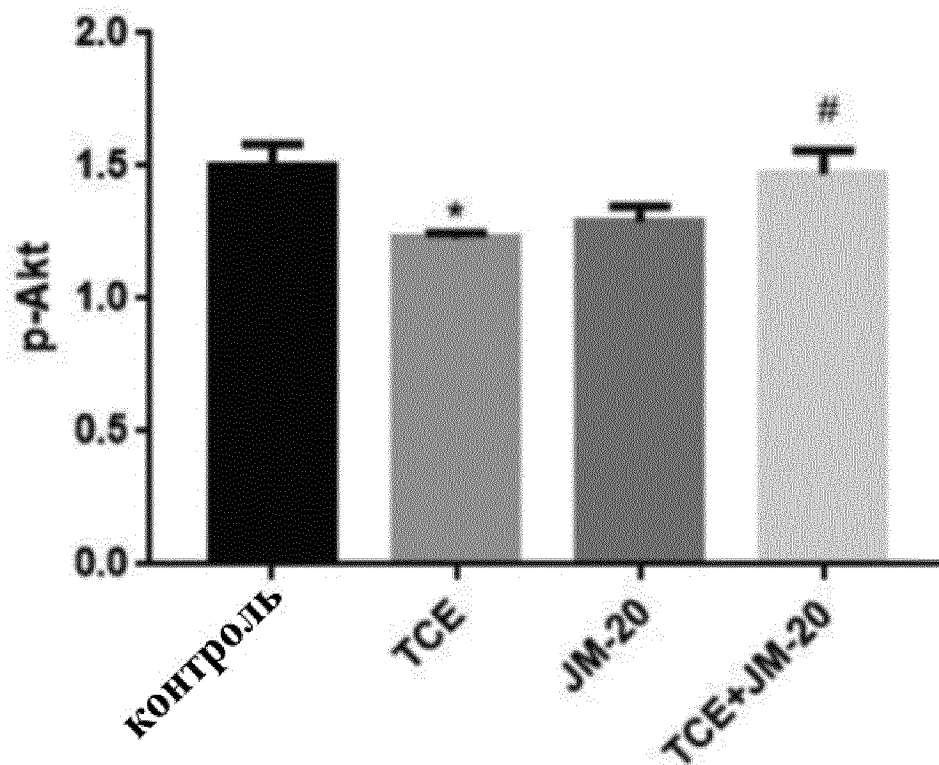
ФИГУРА 5



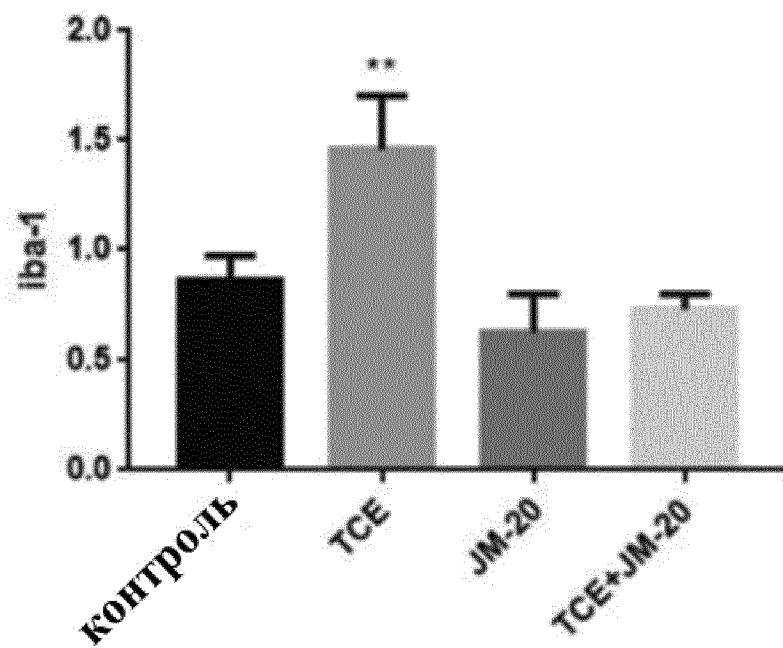
ФИГУРА 6



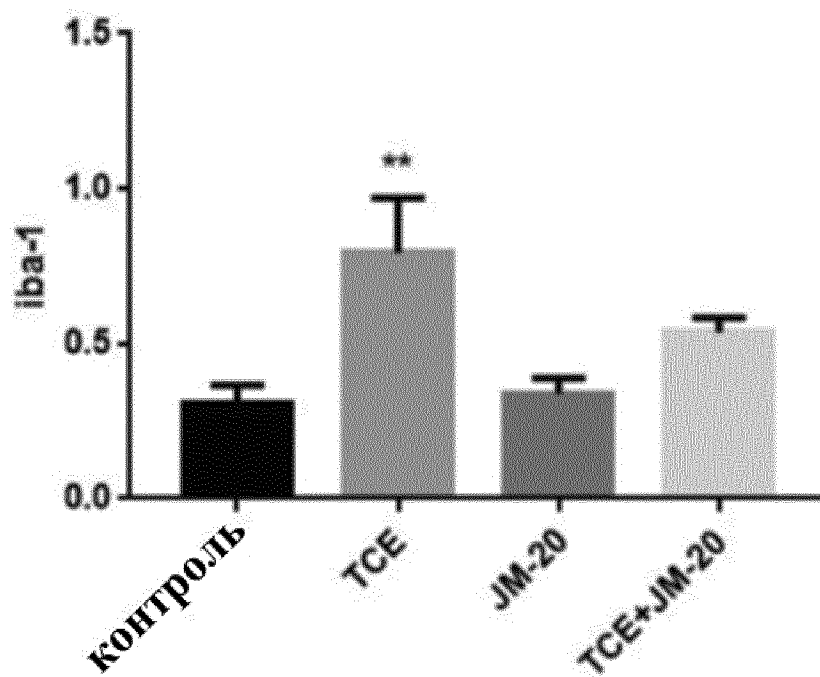
ФИГУРА 7



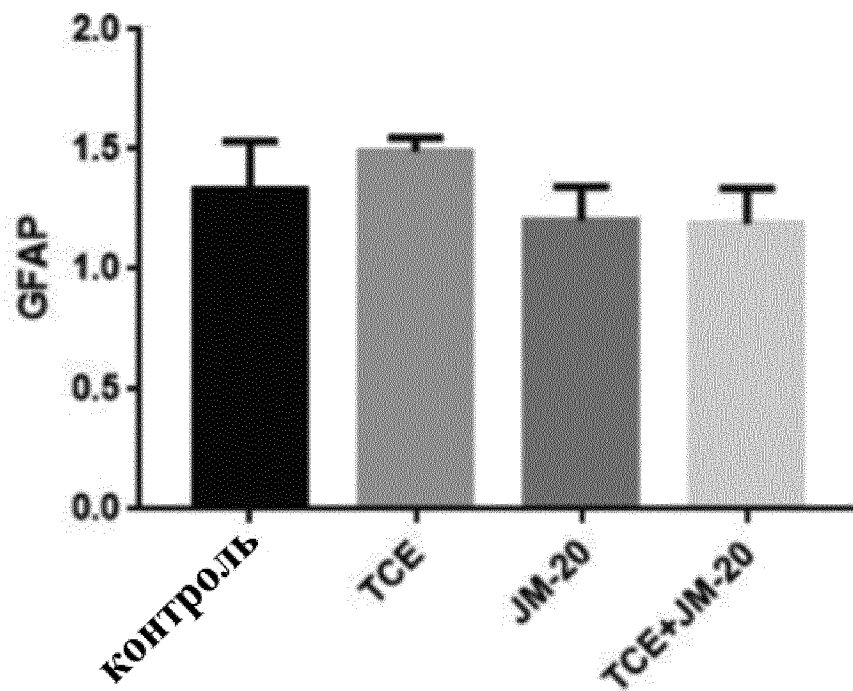
ФИГУРА 8



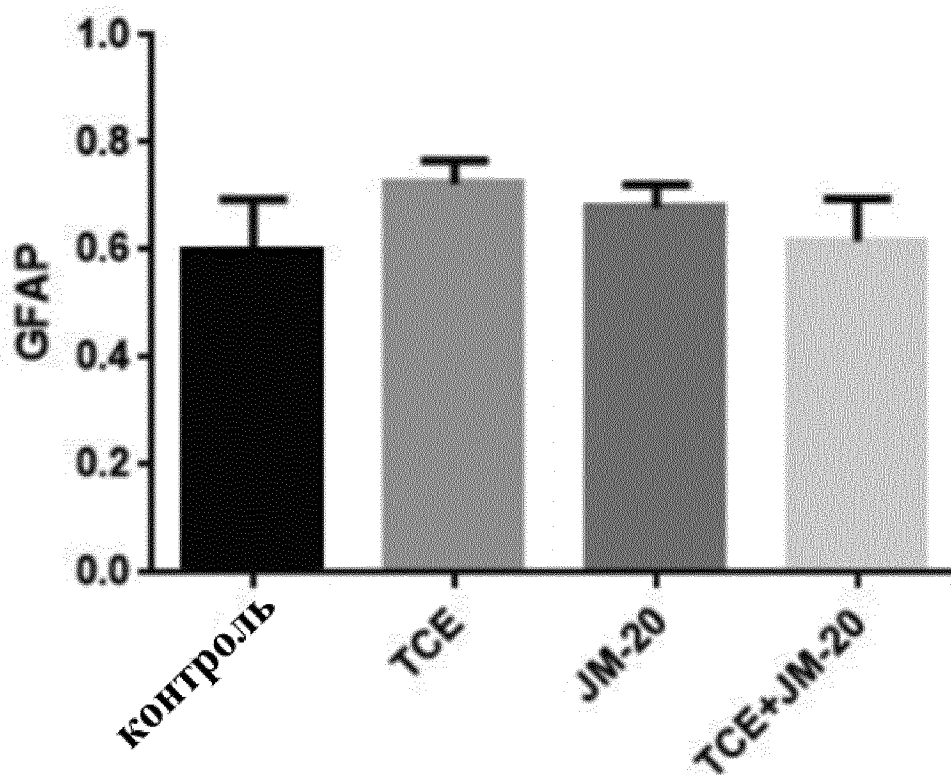
ФИГУРА 9



ФИГУРА 10



ФИГУРА 11



ФИГУРА 12