

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291379** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.28

(51) Int. Cl. **C07D 471/04** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.05.03

(54) ПРОДУКТ НА ОСНОВЕ БЕНЗОДИАЗЕПИНА С АКТИВНОСТЬЮ НА ЦЕНТРАЛЬНУЮ НЕРВНУЮ И СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТУЮ СИСТЕМЫ

(31) **2016-0058**

(32) **2016.05.04**

(33) **CU**

(62) **201892461; 2017.05.03**

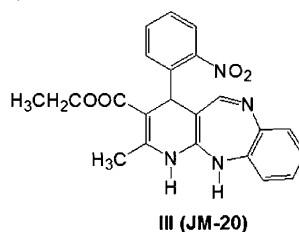
(71) Заявитель:
**УНИВЕРСИДАД ДЕ ЛА
ГАВАНА; СЕНТРО ДЕ
ИНВЕСТИГАСИОН И ДЕСАРРОЛЬО
ДЕ МЕДИКАМЕНТОС СИДЕМ (CU)**

(72) Изобретатель:

**Нунез Фигуэредо Яниэр, Вонг Гуерра
Майлин, Фонзека Фонзека Луис
Артуро, Гарридо Суарез Барбара
Беатрис, Рамирез Санчез Дженей,
Пардо Андреу Гилберто Лазаро,
Вердеция Рейес Ямила, Очоа
Родригуес Эстаел, Барзага Фернандес
Педро Жильберто, Гонзалес Алфонсо
Никте, Делгадо Хернандес Рене,
Падрон Якис Алехандро Саул (CU)**

(74) Представитель:
Рыбина Н.А. (RU)

(57) Соединение формулы III, его продукты и фармацевтические композиции, содержащие их, для лечения заболеваний центральной нервной и сосудистой систем, в частности нейродегенеративных расстройств с нарушением когнитивных функций, заболеваний, связанных с окислительным стрессом, заболеваний, принимающих участие в митохондриальной дисфункции, болезни Паркинсона и невропатической боли, а также патологических процессов, связанных со старением.



A1

202291379

202291379

A1

ПРОДУКТ НА ОСНОВЕ БЕНЗОДИАЗЕПИНА С АКТИВНОСТЬЮ НА ЦЕНТРАЛЬНУЮ НЕРВНУЮ И СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТУЮ СИСТЕМЫ

ОПИСАНИЕ

Область техники

Настоящее изобретение относится к профилактике и/или лечению нейродегенеративных заболеваний или заболеваний, связанных с нарушением когнитивных функций, с нежелательной оксидацией или патологическими процессами, связанными со старением.

Нейродегенерация является важной проблемой, которая является общей для многих заболеваний нервной системы, таких как деменции, болезнь Альцгеймера (AD), болезнь Паркинсона (PO) и невропатическая боль (NP). Эти заболевания являются угнетающими, лечить их дорого, а существующие способы лечения не являются адекватными. К актуальности этой проблемы можно добавить того факт, что частота возникновения этих заболеваний, связанных со старением, быстро растет ввиду происходящих демографических изменений.

Прогрессирующее старение населения в мире сопровождается нежелательными последствиями, связанными с увеличением количества нейродегенеративных заболеваний и старческих деменций. По оценкам, во всем мире живет 46,8 миллионов людей с деменцией. По оценкам, что это количество будет увеличиваться практически вдвое каждые 20 лет; до 74,7 миллионов в 2030 г. и 131,5 миллионов к 2050 г. Деменция также имеет огромное влияние на экономику.

На сегодняшний день оцениваемые затраты в мире в отношении деменции составляют 818 миллиардов долларов и к 2018 г. станет заболеванием с затратами в триллион долларов, с очень большим влиянием на качество жизни как пациентов, так и членов их семей и опекунов (Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2015. London: Alzheimer's Disease International; 2015).

Из всего этого следует, что AD является наиболее широко распространенной, причем приблизительно 35 миллионов людей страдают от заболевания, и оценивается, что ее частота значительно возрастет в следующие три десятилетия, наравне со средним возрастом населения (Reitz, C.; Brayne, C.; Mayeux, R. Epidemiology of Alzheimer's disease. Nat. Rev. Neurol., 2011, 7, 137-152) (Reitz, C.; Mayeux, R. Alzheimer's disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. Biochem. Pharmacol., 2014, 88, 640-651).

AD является нейродегенеративным расстройством головного мозга, которое приводит к потере памяти и потере когнитивных функций, прогрессирует медленно, часто сопровождается изменениями поведения, такими как агрессия и депрессия (Querfurth, H.W.; LaFerla, F.M. Alzheimer's disease. N. Engl. J. Med., 2010, 362, 329-344). На ее последней стадии пациенты прикованы к постели, страдают недержанием мочи и зависят от ухода, который является очень дорогостоящим для семей. В среднем, летальный исход происходит через 9 лет после установления диагноза (Citron M. (2004). Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. Nat Rev Neurosci. 5(9): 677-85).

Большое число людей, страдающих от этого заболевания, требующих круглосуточного ухода и других услуг, будут сильно влиять на медицинские, материальные и человеческие ресурсы (Suh Y.H. and Checler F. (2002). Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-15 synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. Pharmacol Rev. 54(3): 469-525). Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-15 synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. Pharmacol Rev. 54(3): 469-525). Таким образом, это является растущей проблемой в медицине.

AD представляет собой прототипическую кортикальную деменцию, характеризующуюся потерей памяти совместно с дисfazией (нарушением речи, при котором происходит нарушение речепроизводства и понимания речи), диспраксией (нарушением координации и неспособностью выполнять определенные движения и жесты в отсутствие моторных нарушений) и агнозией (неспособностью распознавать объекты, людей, звуки, формы или запахи), относящимися к вовлечению кортикальных ассоциативных зон (Crook R. et al. (1998). A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1. *Nat Med.* 4(4): 452-5) (Houlden H., Baker M., et al. (2000). Variant Alzheimer's disease with spastic paraparesis and cotton wool plaques is caused by PS-1 mutations that lead to exceptionally high amyloid-beta concentrations. *Ann Neurol.* 48(5): 806-8) (Kwok J.B., Taddei K., et al. (1997). Two novel presenilin-1 mutations in early-onset Alzheimer's disease pedigrees and preliminary evidence for association of presenilin-1 mutations with a novel phenotype. *Neuroreport.* 8(6): 1537-42) (Verkkoniemi A., Kalimo H., et al. (2001). Variant Alzheimer disease with spastic paraparesis: neuropathological phenotype. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60(5): 483-92).

Хотя заболевание является многофакторальным и гетерогенным, оно имеет несколько общих характеристик, таких как обширные потери холинергических нейронов, накопление нейрофибриллярных клубков и бета-амилоидных агрегатов (Huang, Y.; Mucke, L. *Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies.* Gel/, 2012, 148, 1204-1222).

Химическая патология AD демонстрирует большую схожесть с болезнью Паркинсона (PD): окислительный стресс, сниженная активность митохондриального комплекса I, повышенное свободнорадикальное окисление липидов. Эти схожести также включают прогрессирующую природу заболевания, пролиферацию реакционноспособной микроглии вокруг отмирающих нейронов, окислительный стресс и воспалительные процессы.

Несмотря на большие капиталовложения в фармацевтической промышленности, существует только несколько, а фактически нет никаких эффективных способов лечения AD.

Сегодня следуют различным стратегиям для получения новых лекарственных средств для лечения заболевания, при условии, что наблюдали, что одобренные на сегодняшний день лекарственные средства обеспечивают немного преимуществ для пациентов. Эти лекарственные средства временно задерживают (в лучшем случае на год) некоторые симптомы заболевания, но они не предотвращают его развитие.

Даже хотя изначально AD связывали только с холинергическим дефицитом, было показано, что другие нейромедиаторы, такие как допамин, норадреналин, серотонин и глутамат, сокращаются или не регулируются при AD. На данный момент нейромедиаторы, наиболее изученные в патогенезе AD, являются холинергическими и глутаматергическими (Palmer, AM; Gershon, S. Is the neuronal basis of Alzheimer's disease cholinergic or glutamatergic? *FASEB J* 1990, 4, 2745-52).

Существующие варианты терапии AD основаны на ингибировании ацетилхолинэстеразы при помощи таких лекарственных средств, как донепезил, галантамин или ривастигмин, или на способности мемантина противодействовать глутаматному рецептору, NMDA (N-метил-D-аспартат). Ввиду низкой доли успешных попыток при помощи этих лекарственных средств, были открыты новые линии исследования. (Bartus, RT, Dean, RL 3rd; Beer, B; Lippa, AS The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 1982, 217, 408-14) (Terry, A.V. Jr.; Buccafusco, J.J. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2003, 306, 821-827) (van Marum, R. J. Current and future therapy in Alzheimer's disease. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 2008, 22, 265-274).

Согласно холинергической гипотезе AD, потеря холинергических функций в центральной нервной системе (ЦНС) делает значительный вклад в нарушение когнитивного процесса, связанного с AD

(Bartus, R.; Dean, R.; Beer, B.; Lippa, A. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, 1982, 217, 408-414). Кроме того, даже хотя взаимосвязь между холинергическим истощением, амилоидогенезом и фосфорилированием тау-белка является сложной, кажется, что холинергическое снижение может повышать продукцию В-амилоида, и это может вызывать фосфорилирование тау-белка. С другой стороны, глутаматергическая гипотеза AD показывает, что эксайтотоксичные механизмы, связанные с глутаматом, включают рецептор NMDA, приводящий к дегенерации и некрозу клеток (Bleich S, Romer K, Wiltfang J, Komhuber J. Glutamate and the glutamate receptor system: a target for drug action. *Int J Geriatr Psychiatry* 2003, 18,833-40). Синаптическое возбуждение посредством рецепторов NMDA важно для функций запоминания и памяти, но избыток глутамата может вызывать эксайтотоксичность и нейродегенерацию (Michaels RL, Rothman SM глутамат neurotoxicity in vitro: antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations. *J Neurosci* 1990 10, 283-92).

При этом сценарии стратегии лечения должны препятствовать обеим системам при помощи комбинации ингибитора фермента AChE, способного улучшать холинергический тонус, с антагонистом рецептора NMDA, способным сопротивляться индуцированной глутаматом нейродегенерации. Тем не менее, эта комбинация терапий имеет несколько недостатков. Помимо противостояния введению отдельных лекарственных средств, создается дополнительная проблема для пациентов старшего возраста, страдающих от AD, и для людей, которые ухаживают за ними, заключающаяся в том, что различные фармакокинетики соответствующих лекарственных средств могут иметь различную фармакодинамику. На практике, больницы не будут приветствовать комбинированную терапию двумя различными кривыми ADME (введение, распределение, метаболизм и выделение).

Альтернативный и новый подход к комбинации двух медикаментов заключается в двух лекарственных средствах, которые могут воздействовать на множество фармакологических мишеней, так называемых многоцелевых лекарственных средствах (MTD).

Стратегия воздействия на два или более белков одновременно простым соединением может обеспечивать превосходные терапевтические эффекты (Cavalli A, Bolognesi ML, Minarini A, Rosini M, Tumiatto V, Recanatini M, Melchiorre C. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases *J Med Chem* 2008, 51, 347-72) (Zimmerman GR, Lehar J, Keith CT. Multi-target therapeutics; when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discov Today* 2007, 12, 34-42) (Morphy R, Ranilovic, Z. Fragments, network biology and designing multiple ligands. *Drug Discov Today* 2007, 12, 156-60). Это можно объяснить рядом потенциальных выгод, обеспечиваемых использованием MTD относительно коктейлей или многокомпонентных медикаментов. Преимущества MTD относительно коктейлей можно подытожить следующим образом: 1) снижение изменчивости клинического развития, при условии, что прогнозирование фармакокинетики простого соединения намного проще, чем для коктейля, преодолевая проблему различных биодоступностей, фармакокинетики и метаболизма; 2) безопасность фармакодинамики; 3) повышенная эффективность ввиду синергического эффекта ингибирования множества терапевтических мишеней, и 4) повышенная безопасность при снижении вторичных эффектов потребления коктейлей лекарственных средств (снижение рисков ввиду взаимодействий лекарственное средство-лекарственное средство); это особенно характерно для метаболизма лекарственных средств, где конкуренция различных лекарственных средств для такого же метаболического фермента влияет на их токсичность.

Другим важным преимуществом является упрощенный терапевтический режим с улучшенными возможностями комплаенса, и это особенно важно для пациентов с болезнью Альцгеймера старшего возраста и их опекунов (Small, G, Dubois B A review of compliance to treatment in Alzheimer's disease: potential benefits of a transdermal patch. *Curr Med Res Opin* 2007, 23, 2705-13). В этом отношении важным аспектом является то, что пациенты с болезнью Альцгеймера

подвержены широкому диапазону медицинских состояний (сопутствующим заболеваниям), которые включают гипертонию, сосудистые заболевания и диабет, которые часто могут быть сопутствующими. Таким образом, проблемы, связанные с использованием нескольких фармацевтических средств для населения старческого возраста, были признаны критическими в последние годы. Эти проблемы главным образом заключаются во взаимодействии лекарственных средств, что происходит чаще у этой части населения ввиду сосуществования хронических заболеваний и отказов органов. Нельзя предположить, что два лекарственных средства, которые сами по себе являются безопасными, будут также безопасны при объединении, особенно у населения преклонного возраста. Кроме того, ряд лекарственных средств, вводимых одновременно, должен быть снижен настолько, насколько это возможно, поскольку пожилой возраст является непредсказуемым фактором риска для любого лечения лекарственными средствами (Turnheim, K. When drug therapy gets old: pharmacokinetics and pharmacodynamics in the elderly. *Exp. Geront.* 2006, 38, 843-853). Поскольку MTD являются особенно предпочтительными относительно комплексных терапий в отношении сложности взаимодействий между многофункциональными лекарственными средствами, сопутствующими заболеваниями, измененными чувствительностями к фармакодинамике и изменениями фармакокинетики у людей пожилого возраста. Клиническое использование MTD может также упростить терапевтический режим (Youdim, M.B., and Buccafusco, JJ (2005) CNS Targets for multi-functional drugs in the treatment of Alzheimer's and Parkinsons diseases *J. Neural Transm* 112, 519-537). Комплаенс с предписанными режимами приема лекарств важен для эффективного лечения. Некомплаенс представляет общую проблему, но это проблема для пациентов с болезнью Альцгеймера и их опекунов (Small, G, Dubois B A review of compliance to treatment in Alzheimer's disease: potential benefits of a transdermal patch. *Curr Med Res Opin* 2007, 23, 2705-13). Следовательно, упрощенный режим лечения лекарственными средствами, действующими на множество мишеней, будет повышать следование лечению. Все указанные выше преимущества не доступны для коктейлей лекарственных средств.

Стратегия лиганда 1 для множества мишеней является новым подходом для разработки новых кандидатов для лечения сложных неврологических заболеваний, особенно ввиду того факта, что основные процессы, вовлеченные в нейродегенеративные заболевания, по своей природе являются многофакторными (Cavalli A, Bolognesi ML, Minarini A, Rosini M, Tumietti V, Recanatini M, Melchiorre C. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases *J Med Chem* 2008, 51, 347-72). Такая стратегия основана на концепции, что одно единственное соединение может действовать на множество мишеней, способствующих нейродегенеративному процессу, предполагаемому при болезни Альцгеймера и при других нейродегенеративных заболеваниях, и что таким образом будет предотвращать нежелательное замещение между взаимодействующими патогенными путями. Но MTD могут представлять альтернативную практику для использования комбинаций лекарственных средств. Поскольку основная масса нейродегенеративных механизмов одинакова для многих нервных заболеваний, эти MTD также могут быть использованы в качестве лекарственного средства для лечения других заболеваний.

Глобальное бремя ишемического инсульта почти в 4 раза превышает геморрагический инсульт. Существующие доказательства подтверждают, что у 25-30% переживших ишемический инсульт сразу же или через некоторое время развиваются сосудистые нарушения когнитивных функций или сосудистая деменция. Деменция после инсульта может включать все типы когнитивных расстройств. Поскольку риск летального исхода после инсультов снизился, число переживших инсульт, имеющих нарушения работы мозга и нарушение когнитивных функций, повысилось (R.N. Kalaria, et al., Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia, *Biochim. Biophys. Acta* (2016), <http://cix.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.01.015>).

Деменция после инсульта рассматривается как нозологическая форма, определяющая все типы деменции, возникающие после инсульта, помимо того, включает ли это сосудистые,

нейродегенеративные или комбинацию двух процессов. Это включает комплексную этиологию с различными комбинациями заболеваний больших и малых сосудов, а также нейродегенеративные патологии (R.N. Kalaria, et al., Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia, Biochim. Biophys. Acta (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.01.015>).

Из знаний, которые имеются относительно каскада ишемических повреждений, мы знаем, что оно состоит из ряда сложных событий, которые являются очень гетерогенными (R. Brouns, P.P. De Deyn, The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke, Clin. Neurol. Neurosurg. 111 (2009) 483-495), развивающиеся за минуты-дни и недели после исходного явления недостаточной перфузии. Основные явления включают недостаток энергии ввиду прерванного кровотока, эксайтотоксичность, перегрузка кальцием, окислительный стресс, дисфункция гематоэнцефалического барьера, капиллярные повреждения, гемостатическая активация, повреждения, связанные с воспалительной и иммунной реакцией и некроз клеток на уровне нейронов, глии и эндотелиальных клеток.

Капиллярные повреждения и разрушение гематоэнцефалического барьера, которые могут происходить через много дней, приводят к вазогенному отеку и может также вызывать кровоизлияния. В то же время, ткани могут подвергаться сложному диапазону заживляющих и ремоделирующих реакций, что включает ангиогенез для ограничения повреждения и снижения последствий. Эти явления отброшены в стареющем головном мозге, так что паренхима необратимо повреждается, при этом содействуя нарушению когнитивного процесса (R.N. Kalaria, et al., Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia, Biochim. Biophys. Acta (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.01.015>).

Экспериментальные исследования показали, что смерть клеток после ишемического нарушения сильно связана с некрозом. Тем не менее, недавние разработки показали, что смерть нервных клеток в значительной степени происходит ввиду апоптоза, а также смешанных механизмов (R.N. Kalaria, et al., Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia, Biochim. Biophys. Acta (2016),

Нейровоспаление и иммунодепрессия также связаны с инсультом, старением и инфекцией. Вероятно, это имеет разрушительное действие на когнитивную функцию после инсультов (B.W. McColl, S.M. Allan, N.J. Rothwell, Systemic inflammation and stroke: aetiology, pathology and targets for therapy, Biochem. Soc. Trans. 35 (2007) 1163-1165) (C. Meisel, A. Meisel, Suppressing immunosuppression after stroke, N. Engl. J. Med. 365 (2011) 2134-2136) (W. Swardfager, O.A. Winer, N. Herrmann, S. Winer, K.L. Lanctot, Interleukin-17 in post-stroke neurodegeneration, Neurosci. Biobehav. Rev. 37 (2013) 436-447).

Болезнь Паркинсона (РО) представляет собой нейродегенеративное заболевание с симптомами нарушения движения, медленными движениями, оцепенелостью, треморами в состоянии покоя и изменениями равновесия. По мере развития болезни у многих пациентов развиваются не связанные с движением симптомы, включая тревогу, депрессию, запор и деменцию.

Эти характеристики связаны с сильным снижением содержания допамина в полосатом теле и потере дофаминергических нейронов в компактной части черного вещества (Gauthier, 1982).

Клинические признаки РО возникают после того, как некроз дофаминергических нейронов превышает пороговый уровень 70-80% и потеря нервных окончаний в полосатом теле превышает 50-60% (Agid, 1991).

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

Несмотря на то, что существуют лекарственные средства, которые облегчают симптомы болезни Паркинсона, постоянное использование этих лекарственных средств неэффективно для предотвращения прогрессирования РО и было связано с ослабляющими вторичными эффектами. Таким образом, особый интерес представляет разработка нейропротекторных терапий, которые отсрочивают или даже останавливают развитие дегенеративных процессов.

К сожалению, разработка нейропротекторных терапий была приостановлена ввиду ограниченных знаний патогенеза дегенеративных неврологических заболеваний, таких как РО. Этиология и патогенез, ответственные за нервные нарушения при болезни Паркинсона, до сих пор неизвестны. Некоторые доказательства подтверждают теорию активации микроглии, а воспалительные процессы включены в каскад событий, которые приводят к прогрессивной дегенерации нейронов (Kreutzgber, GW, 1996 Trends Neurosci, 19:312-318). Активированная микроглия находится вблизи нейронов при дегенерации в черном веществе пациентов с болезнью Паркинсона (McGeer, PL et al, 1988, Neurology, 38:1285-1291).

Ход классического лечения РО заключается в введении агонистов допамина, таких как леводопа (L-ОРА) и карбидопа. В общем, назначают другие лекарственные средства с выраженной целью или замены допамина или ингибирования его разложения, такие как ингибиторы катехол-О-метилтрансферазы и амантадина (N. L. Diaz, C. H. Waters, Expert Rev Neurother 9, 1781 (Dec 1, 2009).

Хотя такие лекарственные средства, как правило, снимают симптомы у пациента, они не всегда эффективны и/или допустимы в течение времени, причем дискинезия является вторичным эффектом (A. H. Schapira et al., European Journal of Neurology 16, 1090 (2009)). Другим осложнением является тот факт, что ежедневное лечение может быть обременительным и уменьшает соблюдение приема препарата пациентом. Таким образом, на сегодняшний день упор делают на новые системы введения лекарственных средств, которые могут обеспечивать непрерывную инфузию агонистов допамина путем помещения мининасосов (например, энтеральных, подкожных) и для введения через кожу посредством накожных пластырей (A. H. Schapira et al., European Journal of Neurology 16, 1090 (2009)). Даже с развитием таких лекарственных средств и их систем введения, некоторые пациенты с болезнью Паркинсона тем не менее все еще не получают достаточного ослабления симптомов (N. L. Diaz, C. H. Waters, Expert Rev Neurother 9, 1781 (Dec 1, 2009).

Экспериментальные модели митохондриальных заболеваний обычно включают ингибирование ферментов, вовлеченных в электрон-транспортную цепь (1). Также было отмечено, что множество нейродегенеративных заболеваний связаны с митохондриальной дисфункцией (2-5). Дефекты 1, 11 и IV комплексов в дыхательной цепи митохондрий были обнаружены при болезнях Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона и Лу Герига (6-9).

Некоторые доказательства подразумевают, что болезнь Паркинсона представляет собой заболевание, которое включает свободные радикалы и митохондриальную дисфункцию, что приводит к отказу энергетической продуктивности (10-11). Повышенное окислительное повреждение, нехватка допамина, нитрирование белков, накопление железа, добавление белков и апоптоз являются характерными для болезни Паркинсона (12-14).

Множество эпидемиологических исследований показали, что широко распространена хроническая боль, серьезно влияя на здоровье людей, здравоохранение и социальные услуги (Torrance N, Smith BH, Bennett MI, Lee AJ. The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. J Pain 2006; 7:281-289) (Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J. Redefinition of neuropathic pain and a grading system for clinical use: consensus statement on clinical and research diagnostic criteria. Neurology 2008; 70:1630-1635). В частности, было оценено, что хроническая боль с невропатическим содержанием влияет приблизительно на 7-8% всего

населения, а терапии, доступные для их лечения, все еще неудовлетворительны (Torrance N, Smith BH, Bennett MI, Lee AJ. The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. *J Pain* 2006; 7:281-289) (van Hecke O, Austin SK, Khan RA, Smith BH, Torrance N. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *Pain* 2014; 155:654-62) (Bennett MI, Rayment C, Hjermstad M, Aass N, Caraceni A, Kaasa S. Prevalence and aetiology of neuropathic pain in cancer patients: A systematic review. *Pain* 2012; 153:359-365). NP рассматривается как симптом нейродегенерации, следовательно, логично рассмотреть нейропротективное действие как стратегию предотвращения его начала, борьбы с прогрессированием и даже возврата нервных повреждений, приводящих к этим симптомам хронической боли (Bordet T and Pruss RM. Targeting neuroprotection as an alternative approach to preventing and treating neuropathic pain. *Neurotherapeutics* 2009; 6:648-662). Нейропротективное действие включает способы, которые поддерживают выживаемость нейронов или их работу в контексте патологического стресса (травматических, токсических, ишемических или метаболических событий). Таким образом, на сегодняшний день лечение большинства невропатий периферической и центральной NP (болезненная диабетическая невропатия, дистальная полинейропатия, сенсорная дистальная, обусловленная ВИЧ, и антиретровирусная терапии, периферические нейропатия, вызванные химиотерапией, постгерпетическая невралгия, боль MS и боль после инсульта и т.д.) направлены на эту область (Bordet T and Pruss RM. Targeting neuroprotection as an alternative approach to preventing and treating neuropathic pain. *Neurotherapeutics* 2009; 6:648-662) (Flatters SJL, Bennett GJ. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: Evidence for mitochondrial dysfunction. *Pain* 2006; 122: 245-257) (Jaggi AS, Singh N. Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. *Toxicology* 2012; 291 :1-9). Особое внимание уделяется глутаматергической дисфункции, нитро-окислительному стрессу, митохондриальной дисфункции, апоптозу, трофическим факторам, нейровоспалению и изменениям в неповрежденных волокнах, вызванным нейродегенерацией (Bordet T and Pruss RM. Targeting neuroprotection as an alternative approach to preventing and treating neuropathic pain. *Neurotherapeutics* 2009; 6:648-662) (DeLeo JA, Sorkin LS, Watkins LR, editors. *Immune and glial regulation of pain*. Seattle: IASP Press; 2007) (Park ES, Gao X, Chung JM, Chung K. Levels of mitochondrial reactive oxygen species increase in rat neuropathic spinal dorsal horn neurons. *Neuroscience Letters* 2006; 391:108-111). Биологами было высказано предложение о разработке новых методов лечения боли, основанных на участии электронной транспортной цепи при невропатиях, зависящих от АТФ (Joseph EK, Levine JD. Mitochondrial electron transport in models of neuropathic and inflammatory pain. *Pain* 2006; 121:105-114) (Joseph EK, Levine JD. Multiple PKC-dependent mechanisms mediating mechanical hyperalgesia. *Pain* 2010; 150:17-21). Также была отмечена митохондриальная зависимость фактора роста нервов (NGF) при индуцировании механической гипералгезии (Chu C, Levine E, Gear RW, Bogen O, Levine JD. Mitochondrial dependence of nerve growth factor-induced mechanical hyperalgesia. *Pain* 2011; 152:1832-1837).

Согласно этим идеям, множество иммунных медиаторов, вовлеченных в процесс валлеровского перерождения (WD), которое происходит тогда, когда непрерывность нервного волокна нарушается, были предложены в качестве новых мишеней для лечения NP лекарственными средствами (Debovy P. Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. *Annals of Anatomy* 2011; 193: 267-275) (Lingor P, Koch JC, Tanges L, Bahr M. Axonal degeneration as a therapeutic target in the CNS. *Cell Tissue Res* 2012; 349:289-311). Роль, выполняемая нейроиммунной активацией, микроглия-нейронной сигнализацией и окислительным стрессом, также была признана в усилении передачи после повреждений нервов (Berger JV, Knaepen L, Janssen SPM, Jaken RJP, Marcus MAE, Joosten EAJ, Deumens R. Cellular and molecular insights into neuropathy-induced pain hypersensitivity for mechanism-based treatment approaches. *Brain Research Reviews* 2011; 67: 282-310) (De Leo J.A, Tawfik VL, La Croix-Fralish ML. The tetrapartite synapse: Path to CNS sensitization and chronic pain. *Pain* 2006;122:17-21) (Austin PJ,

Moalem-Taylor G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: Involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines *Journal of Neuroimmunology* 2010; 229:26-50 (Salvemini D, Little JW, Doyle T, Neumann WL. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. *Free Radical Biology & Medicine* 2011; 51:951-966).

Следовательно, новые стратегии, направленные на нейропротективное действие и, в частности, нейровоспаление для лечения НР, на сегодня находятся на этапе научных исследований и разработки (Bordet T and Pruss RM. Targeting neuroprotection as an alternative approach to preventing and treating neuropathic pain. *Neurotherapeutics* 2009; 6:648-662) (Stavniichuk R, Drel VR, Shevalye H, Maksimchyk Y, Kuchmerovska TM, Nadler JL, Obrosova IG. Baicalein alleviates diabetic peripheral neuropathy through inhibition of oxidative-nitrosative stress and p38 MAPK activation. *Experimental Neurology* 2011; 203:106-113).

Старение и неврологические и психиатрические расстройства вызывают повреждение и смерть нейронов. Среди частых и соответствующих изменений нервной системы мы включили, помимо прочего, дегенерацию нейронов, ишемию, воспаление, иммунные реакции, травму и рак. В результате них, нейроны могут погибать за минуты или часы, или они могут выдерживать исходное повреждение в поврежденном состоянии, активируя нейродегенерацию и, наконец, также приводя к смерти клеток.

Нейродегенерация при болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваниях, по всей видимости, является многофакторной, так что большой диапазон токсичных реакций, включая воспаление, глутаматергическую нейротоксичность, увеличение содержания железа и оксида азота, истощение эндогенных антиоксидантов, сниженная экспрессия трофических факторов, дисфункция убиквитин-протеасомной системы и экспрессия проапоптотических белков, приводят к некрозу нейронов.

Учитывая важность нервной системы для создания основных двигательных навыков и чувствительности, существует интерес к поиску терапевтического средства для защиты нервной системы.

Нейропротективное действие направлено на сохранение, восстановление, лечение или регенерацию нервной системы, ее клеток, структуры и функции (Vajda et al 2002, *J Clin Neurosci* 9:4-8). Одной из целей нейропротективного действия является предотвращение или минимизация влияния первоначального поражения нервной системы или предотвращение или минимизация последствий эндогенных или экзогенных вредных процессов, которые вызывают повреждение аксонов, нейронов, синапсов и дендритов.

Нейропротективное действие представляет собой механизм и стратегию, используемые для защиты от повреждения нейронов или дегенерации ЦНС в результате хронического нейродегенеративного заболевания (болезнь Альцгеймера, Паркинсона). Целью нейропротективного действия является ограничение дисфункции/смерти после травмы ЦНС и попытка сохранить максимально возможную целостность для клеточных взаимодействий в головном мозге, что приводит к нетронутой нейронной функции.

Концепция нейропротективного действия была применена к хроническим заболеваниям головного мозга, а также к острым неврологическим состояниям, учитывая, что некоторые из основных механизмов, поражающих ЦНС, подобны этим состояниям. Нейродегенеративные расстройства включают AD, PO, болезнь Гентингтона и боковой амиотрофический склероз. Нейропротективное действие рассматривалась как механизм действия лекарственного средства, используемый для лечения этих состояний.

Существует широкий спектр нейропротекторных продуктов, доступных или исследуемых, и некоторые продукты могут потенциально использоваться для более чем одного заболевания,

учитывая, что многие механизмы повреждения нейронных тканей подобны. Продукты с нейропротекторными эффектами сгруппированы в следующие категории: похитители свободных радикалов, антиэксцитотоксичные агенты, ингибиторы апоптоза (запрограммированная гибель клеток), противовоспалительные агенты, нейротрофические факторы, хелатные ионы металлов, модуляторы ионных каналов и генная терапия.

Было продемонстрировано, что свободные радикалы кислорода связаны с денатурализацией белков, инактивацией ферментов и повреждением ДНК, что приводит к перокислению липидов клеточных мембран и, наконец, гибели клеток при нейродегенеративных заболеваниях.

Исследования, проведенные как на моделях животных, так и на человеческих моделях, показывают, что потеря равновесия среди частиц-окислителей, генерируемых метаболизмом в мозге и антиоксидантными защитными механизмами, вызывает так называемый окислительный стресс, когда указанные системы защиты снижают свою эффективность и нарушаются. Этот окислительный стресс увеличивается с возрастом и обнаружен среди основных причин патогенеза AD (Neurobiol. Aging 2007, 28, 1009-1014), возможно связанных с нейронными митохондриальными дисфункциями.

Мы также знаем, что продукты с антиоксидантными свойствами способны предотвращать апоптоз, индуцированный амилоидным пептидом, а также изменения гомеостаза Ca^{2+} в культурах кортикальных нейронов (Lite Sci. 2000, 66, 1879-1892). Следовательно, существует большая потребность в ингибиторах ацетилхолинэстеразы (AChE) или бутирилхолинэстеразы (BuChE) и с нейропротекторной способностью от токсических повреждений, таких как окисленные свободные радикалы, причем указанные соединения будут иметь большое медицинское значение при лечении нейродегенеративных заболеваний, таких как AD, PO или Гентингтона.

Говоря в общем, стратегии лечения часто основаны на модуляции одного фактора предлагаемого поражения. Хотя мы можем наблюдать, что указанные виды лечения являются выгодными в очень ограниченных животных моделях, менее вероятно, что они продемонстрировали бы свою эффективность при более сложных человеческих расстройствах с более высокой степенью тяжести поражения в генетически разнообразной популяции (Faden and Stoica, 2007. Arch Neurol 64: 794-800). В значительной степени, учитывая предполагаемые механизмы гибели нейронов, такие как окислительный стресс, митохондриальная дисфункция, добавленные белки, апоптоз и воспаление (oudim, M.B., and Buccafusco, JJ (2005) CNS Targets for multifunctional drugs in the treatment of Alzheimer's and Parkinsons diseases J. Neural Transm 112, 519-537), они настолько сложны, насколько они различны, нам были бы необходимы отдельные соединения, которые имеют многоцелевые эффекты на множественные механизмы поражений.

Соединение (3-этоксикарбонил-2-метил-4-(2-нитрофенил)-4, 11-дигидро-1H-пиридо[2,3-b][1,25]бензодиацепин) (JM-20), которое описано в документе патента республики Куба CU23879 по его химической структуре, может оказывать влияние на сердечно-сосудистые, цереброваскулярные и другие заболевания, связанные с центральной нервной системой.

Неожиданно исследователями было обнаружено, что соединение JM-20 оказывает выраженное терапевтическое действие на ЦНС предпочтительно для лечения таких заболеваний, как различные типы деменции, болезнь Паркинсона и боль.

Таким образом, сущность данного изобретения основана на использовании JM-20 и его химических продуктов, которые предпочтительно используются при лечении таких заболеваний, как различные типы деменции, болезнь Паркинсона и боль.

JM-20 является продуктом бензодиацепина, и широко сообщалось, что бензодиацепины индуцируют деменции (Huber-Geismann, F, 1994) (Rosenberg, P. B., 2015). (Shash, D., T. Kurth, et al.

2015) (Zhong, G., Y. Wang, et al. 2015)), однако JM-20 неожиданно улучшает состояние при различных типах деменций.

Несмотря на то, что потенциальная полезность JM-20 отмечена в литературе, его потенциал в качестве терапевтического лекарственного средства при нейродегенеративных заболеваниях, таких как деменции, болезнь Паркинсона и невропатическая боль, не установлен.

В качестве дополнительного аспекта настоящего изобретения, соединение общей формулы III (JM-20), его соли, гидраты, кристаллические формы, энантиомеры, изомеры, метаболиты, физиологически протестированные пролекарства могут быть введены в смеси по меньшей мере с одним средством-средой, разбавителем и/или носителем, химически инертным, нетоксичным, здесь и далее признаваемым вспомогательными веществами, включенными в предлагаемые композиции лекарственных средств.

Композиции лекарственных средств обеспечиваются для любой жидкой, твердой или полутвердой композиции, они могут быть введены перорально, букофарингеально, сублингвально, парентерально, например: внутримышечно, внутривенно, внутрикожно или подкожно, местно, трансдермально, трахеально, бронхиально, назально, пульмонально, ректально или другими подходящими путями введения.

Описанные композиции лекарственных средств будут содержать подходящие вспомогательные вещества для каждого состава. Составы получают обычно при помощи способов, существующих в данной области техники. Вспомогательные вещества выбирают по их выбранной форме лекарственного средства согласно пути, которым их будут вводить.

Соединение общей формулы III (JM-20), его соли, гидраты, кристаллические формы, энантиомеры, изомеры, метаболиты, пролекарства для его введения людям могут содержаться в фармацевтически приемлемых формах дозирования, среди которых, помимо прочего, находятся эти формы выпуска: таблетки (включая подъязычные, с покрытием и разжевываемые), твердые и мягкие капсулы (включая микрокапсулы, наночастицы и пеллеты), растворы (пероральные капли, сиропы), парентеральные растворы, трансдермальные пластыри, импланты и другие системы ретард, мази (кремы и гели), назальные спреи, мukoадгезивы, суппозитории, суспензии, порошки, которые необходимо разводить или добавлять в пищу, помимо прочих форм дозирования, включенных в настоящее изобретение.

Используя известные технологические процессы уровня техники, JM-20, его соли, гидраты, кристаллические формы, энантиомеры, изомеры, метаболиты, пролекарства, можно составлять в лекарственные формы, приспособленные к их введению, смешивать их с вспомогательными веществами, такими как вспомогательные жидкие, твердые или полутвердые вещества, состоящие из органических и неорганических веществ, природного или синтетического происхождения. Некоторые из них включают: твердые наполнители, разбавители, агглютинирующие вещества, растворители, эмульсии, смазывающие средства, дезинтегрирующие средства, способствующие скольжению средства, ароматизаторы, красители, пигменты, полимеры, подсластители, пластификаторы, усилители поглощения, усилители проникновения, поверхностно-активные вещества, вспомогательные поверхностно-активные вещества, специальные масла и/или буферные системы, которые придают активным соединениям или их физиологически приемлемым солям физическую, химическую и/или биологическую стабильность.

Некоторые вспомогательные вещества, используемые в составе лекарственных форм, содержащих соединение общей формулы III или его продукты, без ограничения использованием других вспомогательных веществ, представляют собой: крахмалы, лактазу, целлюлозу и ее продукты, сахарозу, сорбит, маннит и другие сахара, тальк, коллоидный диоксид кремния, карбонаты, оксиды магния, фосфаты кальция, диоксид титана, поливинилпирролидон, повидон,

желатин, белки молока, цитраты, тартраты, альгинаты, декстран, этилцеллюлозу, циклодекстрины, эластомеры кремния, полисорбаты, амилопектин, парабены, животные и растительные масла, пропиленгликоль, стерилизованную воду, одно- или многоатомные спирты, такие как глицерин, стеарат магния, стеарат кальция, натрия стеарилфумарат, лаурилсульфат натрия, глицерин и воски полиэтиленгликоля, помимо прочего.

Твердые пероральные лекарственные формы, такие как таблетки, микрогранулы, наночастицы, пеллеты, порошки, которые необходимо разводить, или капсулы, содержащие соединение общей формулы III или его соли, энантиомерные формы и продукты окисления-восстановления согласно данному изобретения, могут быть использованы для немедленного или модифицированного высвобождения.

Выбранная форма лекарственного средства, согласно настоящему изобретению, представляет собой таблетки, содержащие, в качестве своего активного фармацевтического ингредиента, соединение общей формулы III или его соли, гидраты, кристаллические формы, энантиомеры, изомеры, метаболиты, пролекарства, получение смеси с микрокристаллической целлюлозой, кукурузным крахмалом, кросповидоном, добавление растворенного поливинилпирролидона и лаурилсульфата натрия с получением гранулята, который сушат в полном процессе в псевдооживленном слое и смешивают со стеаратом магния и тальком, затем таблетки получают при помощи системы вращающихся штампов для их изготовления, наконец на таблетки наносят покрытие из гидроксипропилцеллюлозы, полиэтиленгликоля 4000, диоксида титана и окрашивающей суспензии.

Путем нанесения покрытия на таблетки мы достигаем привлекательный конечный вид и избегаем неприятного вкуса; это достигается маскирующим вкус средством, таким как сополимер метакриловой кислоты, этилцеллюлоза, метилгидроксипропилцеллюлоза или другие полимеры. Таблетки могут быть получены как методом влажной грануляции, показанным выше, так и методом прямого прессования при помощи вспомогательных веществ для прямого прессования и снижения количества стадий на фазе получения таблеток, при условии, что работают с низкими дозами.

Таблетки могут быть с модифицированным высвобождением, и они могут содержать соединение общей формулы III или его продукты в микрогранулах, наночастицах или матричных системах, используя вспомогательные вещества, такие как: полиэтиленоксид, гидроксипропилцеллюлоза 2910, стеарат магния, хлорид натрия, красный оксид железа, ацетат целлюлозы, полиэтиленгликоль 3350 и опадрай.

Согласно настоящему изобретению, композиции лекарственного средства могут содержать фармацевтически приемлемые полимеры, проницаемые, биоразлагаемые и нерастворимые в воде, для регулирования его профиля высвобождения, при этом получая модифицированное высвобождение (немедленное, отсроченное или регулируемое) лекарственных форм. Эти полимеры могут быть использованы для покрытия таблеток, микрогранул, капсул при получении наночастиц, в качестве матриц высвобождения в пеллетах, таблетках, гранулах или смесях с другими вспомогательными веществами, включенными в любую другую лекарственную форму, указанную в настоящем изобретении.

Для перорального введения другие подходящие фармацевтические композиции представляют собой твердые капсулы, мягкие капсулы и фармацевтические порошки, соединение общей формулы III или его соли, энантиомерные формы и продукты его физиологически приемлемых окисления-восстановления можно дозировать в виде твердых желатиновых или целлюлозных капсул, например, содержащих внутри смесь активного фармацевтического ингредиента с обычно используемыми вспомогательными веществами в твердой форме, такими как описанные для таблеток; указанную смесь можно получать сухим путем, влажной грануляцией, экструзией,

таблетированием, в виде микрокапсул или микротаблеток. Для доз в мягких желатиновых капсулах мы используем обычные способы изготовления, и они могут включать смешивание соединения общей формулы III или его солей, гидратов, кристаллических форм, энантиомеров, изомеров, метаболитов, пролекарств с растительными маслами, жиром или другими подобными средами, подходящими для их образования.

В случае фармацевтических порошков, они могут быть получены простым смешиванием соединения общей формулы III (JM-20) или его солей, энантиомерных форм и продуктов его физиологически приемлемых пролекарств с наполнителями, суспендирующими средствами, подсластителями, ароматизаторами и консервантами. Хотя в настоящем изобретении также используется метод сушки атомизацией при температуре на входе 100 °C - 150°C и температурах на выходе 50 °C - 90 °C при получении порошков, используются вспомогательные вещества, такие как декстран, полиэтиленгликоль 4000 и лаурилсульфат натрия, помимо прочего, для улучшения растворимости активного фармацевтического ингредиента для его надлежащего введения в организм в растворах, или добавления его в пищу, такую как соки.

Для ректального введения соединение общей формулы III (JM-20) или его соли, гидраты, кристаллические формы, энантиомеры, изомеры, метаболиты, физиологически приемлемые пролекарства можно дозировать в виде суппозитория, пен или ректальных растворов для микроклизма, которые могут содержать смесь активных соединений с основой из нейтрального твердого жира (Witespol 45) или некоторых других подобных сред, подходящих для их составления; сорбитан моноолеат, полисорбат 20, воск-эмульгатор, ангидратный коллоидный силикон, мета-бисульфит натрия, эддат динатрия, метилпарагидроксилбензоат, фосфаты натрия, макрогол 300, глицерин, воду, пропан, изобутен и н-бутан.

Для жидкого перорального введения соединение общей формулы III (JM-20) или его соли, гидраты, кристаллические формы, энантиомеры, изомеры, метаболиты, физиологически приемлемые пролекарства можно составлять как сиропы, эликсиры, концентрированные капли или суспензии с фармацевтически приемлемой средой, такой как смесь этанола, глицерина, пропиленгликоля и/или полиэтиленгликоля, помимо прочего, карбоксиметилцеллюлоза или другие загустители; он может содержать краситель, ароматизатор, подсластитель (сукралозу, аспартам, цикламат, стевию) и консервант (парабены, бензоаты). Эти жидкие дозировки можно получать на основе разбавления порошкообразных фармацевтических композиций подходящим разбавителем перед использованием.

Для парентерального введения соединение общей формулы III (JM-20) или его соли, гидраты, кристаллические формы, энантиомеры, изомеры, метаболиты, физиологически приемлемые пролекарства можно составлять в виде растворов для инъекции. Эти растворы могут содержать стабилизирующие, консервирующие и/или буферные ингредиенты.

В настоящем изобретении активный фармацевтический ингредиент находится в 69% этанольном растворе, бензойном спирте, пропиленгликоле, бензойной кислоте, бензоате натрия, гидроксиде натрия, воде для инъекции; другие вспомогательные вещества также можно использовать, такие как полиэтиленгликоль 400, цитрат натрия и лимонная кислота.

Растворы для парентерального введения, которые содержат соединение общей формулы III (JM-20) или его соли, гидраты, кристаллические формы, энантиомеры, изомеры, метаболиты, физиологически приемлемые пролекарства, можно также получать путем разведения сухой фармацевтической композиции (лиофилизированной) подходящим разбавителем перед использованием, включая использование вспомогательных веществ, таких как манит, полисорбат 80, хлорид натрия и другие.

Для подкожного введения соединение общей формулы III (JM-20) или его соли, гидраты, кристаллические формы, энантиомеры, изомеры, метаболиты, физиологически приемлемые

пролекарства можно дозировать в виде имплантов при помощи вспомогательных веществ, таких как эластомеры кремния и ангидратный коллоидный силикон, хотя для составления пеллетты могут быть использованы другие фармацевтические полимеры.

Для трансдермального введения соединение общей формулы III (JM 20) или его соли, гидраты, кристаллические формы, энантиомеры, изомеры, метаболиты, физиологически приемлемые пролекарства можно составлять в виде пластырей; в этом случае активный фармацевтический ингредиент содержится в подложке из акрилового полимера, этанол, легкий жидкий парафин, изопропилпальмитат, полиэтилентерефталат, этиленвинилацетат раствор и слоя силикона внутри отрывного слоя (с номинальной скоростью высвобождения 15 мг/день, на площади поверхности 12,75 см²).

ПРИМЕРЫ РЕАЛИЗАЦИИ

Получение синтетического промежуточного продукта, 1,4-дигидропиридина 5-формиата

Соединение II получают на основе превращения I через оксихлорид фосфора, в сухом диметилформамиде, смесь которых затем добавляют в пропорции 3-9 раз для растворения I в дихлорметане или хлороформе и состаривают при температуре 20-60°C в течение 15-20 часов (Фигура 1).

Полученный продукт затем подвергают основному гидролизу, с последующей экстракцией хлороформом или дихлорметаном, очисткой посредством промывания и сушкой.

Соединение I получают многокомпонентной реакцией на одной стадии, где в эквимольных количествах смешивают 2-нитробензола альдегид, кислота Мелдрума, этилацетоацетат и ацетат аммония, в уксусной кислоте в качестве растворителя и подвергают нагреванию с обратным холодильником в течение 7 - 10 часов. После этого смесь выливают в воду, и полученный осадок очищают посредством перекристаллизации в этаноле.

Получение соединения III

Соединение IIa или IIb, полученное ранее, подвергают реакции с ортофенилендиамином в абсолютном этаноле с получением соединения III (JM-20), которое может быть получено с образованием различных солей, в зависимости от условий и используемых реагентов.

Получение соединения III из IIa

Для получения соединения III (JM-20) мы начали с этанольного раствора соединения IIa и добавили эквимольные количества ортофенилендиамина, в абсолютный этанол в качестве растворителя, с перемешиванием. Эквимольные количества или большие (1-2 эквивалента) триэтиламина (Фигура 2, способ A) добавляли в реакционную смесь, поддерживали перемешивание или добавляли достаточные количества (1 - 1,5 эквивалента) гидроксида натрия путем контролируемого капанья и с непрерывным перемешиванием реакционной смеси (Фигура 2, способ B).

Получение соединения III из IIb

Для получения соединения III (JM-20), мы начали с соединения IIb в этанольном растворе и добавили эквимольные количества ортофенилендиамина, в абсолютный этанол в качестве растворителя, при перемешивании. Эквимольные количества или большие (1-2 эквивалента) триэтиламина (Фигура 3, способ A) добавляли в реакционную смесь, поддерживали перемешивание или добавляли достаточные количества (1 - 1,5 эквивалента) гидроксида натрия путем контролируемого капанья и с непрерывным перемешиванием реакционной смеси (Фигура 3, способ B).

Структура изомера соединения JM20 показана на Фигуре 4.

Получение соединения III в виде галогенгидратных солей

Соответствующие гидрохлоридные или гидробромидные соли III (галогенгидраты JM-20) получали из IIa или IIb, соответственно, с или без использования катализатора. Когда соответствующую водородную кислоту добавляли в подходящих каталитических количествах (5-25 мольн. %), происходил каталитический процесс, который снижал время реакции и несколько снижал выход реакции (фиг. 5).

Гидрохлорид JM20 (IIIa) получали надлежащим образом из IIa, и когда подходящие количества HCl добавляли, происходила каталитическая реакция. Соединение JM-20 также может быть получено в виде гидробромид (IIIb) из IIb (фиг. 5), причем характеристики бромид являются лучшей целевой группой, чем хлорид, реакция внутримолекулярного нуклеофильного замещения облегчается, давая быструю и эффективную реакцию с получением JM-20 в виде гидробромид.

Получение соединения III в виде фумаратной соли

Фумаратную соль JM-20 (IIIc) получают из гидрохлорида или гидробромид III при добавлении фумарата мононатрия в раствор IIIa или IIIb, с перемешиванием магнитной мешалкой 2-5 часов (фиг. 6) и его последующим осаждением при добавлении этанола в подходящих количествах.

Осадок, соответствующий фумарату IIIc, подходящим образом фильтруют и промывают, очищают и затем помещают в сушилку с регулируемой температурой под пониженным давлением.

Получение соединения III в виде фосфатной соли

Фосфатную соль JM-20 (IIId) можно получить способом, подобным тому, что описан выше, из IIa или IIb путем добавления эквимольных количеств фосфорной кислоты в начале реакции или путем добавления фосфорной кислоты в IIIa или IIIb в этанольном растворе с перемешиванием (фиг. 7).

Получение соединения III в виде сульфатной соли

Сульфат JM-20 (IIIe) можно получить из IIa или IIb или на основе галогенгидратов IIIa или IIIb, как показано на Фигуре 8.

Получение состава в виде таблетки

Каждая 120,00 мг таблетка содержит:

Компонент	Количество	Функция
JM 20	40,00 мг	Активный компонент
Кукурузный крахмал	23,00 мг	Дезинтегрирующее вещество
Поливинилпирролидон K-25	4,00 мг	Агглютинин
Моногидратированная лактаза	50,50 мг	Наполнитель
Стеарат магния	1,50 мг	Смазывающее вещество
Коллоидный диоксид кремния	1,00 мг	Смазывающее вещество
Этанол класса е *	12,00 мкл	Растворитель

Деионизированная вода*	12,00 мкл	Растворитель
------------------------	-----------	--------------

*Испаряется в процессе сушки.

Краткое описание технологического процесса:

1. Просеять активный компонент, кукурузный крахмал и лактазу через сито 20 меш.
2. Взвесить все компоненты состава согласно количествам, установленным в формуле.
3. Для раствора агглютинаина вылить смесь воды и этилового спирта класса С в металлический контейнер с паровой рубашкой, добавить поливинилпирролидон и встряхивать до полного растворения.
4. Загрузить в смеситель активный компонент, кукурузный крахмал и лактазу (компоненты внутренней фазы). Смешивать в течение 15 мин.
5. Добавить медленно раствор агглютинаина при помощи перистальтического насоса, доводя до необходимой степени влажности при помощи воды и этилового спирта класса С (1:1) при необходимости. Размельчить в мельнице на низкой скорости.
6. Высушить гранулят в псевдоожиженном слое. Через 10 минут отобрать типичный образец гранулята, дегранулировать и протестировать на его остаточную влажность; указанная влажность должна составлять от 0,8 до 1,2%.
7. Смешать сухой гранулят со смазывающими веществами в течение 10 мин.
8. В высокоскоростной центрифуге спрессовать смесь при помощи плоского, скошенного и бороздчатого штампа с диаметром 6,4 мм (1/4 PBR) с получением таблеток со следующими параметрами:

Масса: 120,0 мг $\pm$ 10 %

Высота: 2,6 $\pm$ 0,10 мм

Твердость: 4,0 $\pm$ 1 кг-с

Хрупкость: менее 1%

Получение состава для пероральных капель

Каждый мл (20 капель) содержит:

Компонент	Количество	Функция
JM-20	40,0 мг	Активный компонент
Пропиленгликоль	300,0 мг	Среда-растворитель
Kollidon 25	160,0 мг	Способствующее регулированию вязкости средство
Сахаринат натрия	12,5 мг	Подсластитель
Понсо S, кислотный красный	0,05 мг	Краситель
Лимонная кислота	5,535 мг	Стабилизатор pH

Дегидратированный цитрат натрия	20,0 мг	Стабилизатор pH
Этиловый спирт	100,0 мг	Среда-растворитель
Метилпарабен	1,8 мг	Консервант а.т.
Пропилпарабен	0,2 мг	Консервант а.т.
Жидкий клубничный ароматизатор (растворимый)	20,0 мг	Ароматизатор
Очищенная вода (достаточное количество)	1,0 мл	Среда

Краткое описание технологического процесса:

1. Измерить pH и проводимость очищенной воды в момент изготовления продукта.
2. Вылить пропиленгликоль в реактор.
3. Растворить сахарин натрия в очищенной воде во вспомогательном резервуаре из нержавеющей стали с соответствующей емкостью.
4. Включить Kollidon 25, всыпая его понемногу, перемешивая в течение по меньшей мере 30 минут, пока он полностью не исчезнет.
5. Перемешивать и подавать тепло к препарату, поддерживая температуру на уровне 40 - 50 °C в течение 30 минут.
6. Включить активный компонент в результат первого этапа небольшими порциями, поддерживая постоянное перемешивание в течение 30 минут.
7. Отвести тепло и подождать пока препарат не достигнет комнатной температуры: 30 ± 2 °C.
8. Растворить метилпарабен и пропиленгликоль в этиловом спирте класса С в вспомогательном стакане или резервуаре из нержавеющей стали с подходящей емкостью, постоянно перемешивая, пока он полностью не растворится.
9. В результаты предыдущего этапа добавить растворимый жидкий клубничный ароматизатор и перемешивать до полной однородности.
10. Включить результаты предыдущего этапа медленно в реакторную емкость, постоянно и сильно ее перемешивая.
11. Растворить лимонную кислоту и дегидратированный цитрат натрия в стакане или резервуаре из нержавеющей стали, с подходящей емкостью, перемешивая его после каждого добавления до полного растворения.
12. Медленно внести результаты предыдущего этапа в реакторную емкость, постоянно и сильно ее перемешивая.
13. Растворить понсо S, кислотный красный в очищенной воде в стакане или резервуаре из нержавеющей стали с подходящей емкостью, перемешивания до полного растворения и введение препарата.
14. Снять предварительно приготовленный объем с водой. Перемешать до однородности.

15. Протестировать, что pH поддерживается на уровне 4,0 - 6,0.
16. Провести окончательное фильтрование; протестировать органолептические характеристики.
17. Поместить в бутылку окончательный препарат в бутылки из желтого стекла х 15 мл, с $15,0 \pm 1,0$ мл раствора, надлежащим образом закрыть крышкой, используя крышки с уменьшителями капель для маслянистых продуктов.

Получение инъекционного состава:

Каждая колба (2 мл) JM-20 содержит:

Компонент	каждый мл содержит	Количество на дозу Единица измерения	Функция
JM-20	5,0 мг	10,0 мг	Активный компонент
Cremofor ELP	527,0 мг	1054,0 мг	Среда
Соляная кислота 1 н достаточное количество	-	-	Не регулируемый по pH
Абсолютный спирт достаточное количество	1,0 мл	2,0 мл	растворитель
*Азот достаточное количество	-	-	

1. Проверить, что реактор полностью сухой после стерилизации; если нет, промыть его дегидратированным спиртом.
2. Приготовить раствор 1 н соляной кислоты для регулирования pH.
3. Добавить одну часть Cremofor ELP и дегидратированного спирта в реактор. Смешать при 420 об/мин.
4. Взвесить активный компонент и добавить порции дегидратированного спирта в химический стакан, содержащий его; диспергировать его стеклянной мешалкой и добавит в реактор; повторять эту операцию пока все активные компоненты не будут сметены и весь дегидратированный спирт не будет использован.
5. Поддерживать перемешивание в реакторе в течение 60 минут при 420 об/мин, пока активный компонент полностью не растворится.
6. Добавить остальной Cremofor ELP, считая остаток дегидратированным спиртом, перемешивая его в течение 10 минут при 420 об/мин.
7. Определить pH раствора и довести его 1 н соляной кислотой до 5.0 - 6.0.
8. Добавить объем раствора добавлением дегидратированного спирта. Перемешивать в течение 5 минут при 420 об/мин.
9. Взять 10 мл раствора и направить его в лабораторию для контроля процесса (оценки и pH)
10. Проверить правильность установки систем наполнения и азотирования.

11. Провести проверку целостности на фильтре Sartobran P MidiCaps, пористостью (0,45 + 0,2 мкм) с дегидратированным спиртом.
12. После окончания контроля процесса, поднять давление реактора азотом (0,7-1,0 бар) для выталкивания раствора через картридж фильтра Sartobran P пористостью 0,45 мкм +0,2 мкм. Заполнить и запаять колбы, получая дозы 2,2 мл раствора.

ИССЛЕДОВАНИЯ ПАМЯТИ НА МОДЕЛЯХ ДЕМЕНЦИИ

Реагенты

Все реагенты закупали в Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США). JM-20 вводили в достаточных количествах для исследований, предлагаемых лабораторией органического синтеза на факультете химии Гаванского университета.

Для различных исследований JM-20 суспендировали в карбоксиметилцеллюлозе (СМС) 0,05% и вводили перорально. Бромид скополамина растворяли в 0,9% солевом растворе и вводили внутривентрикулярно (1 мг/кг, 4 мл/кг веса). Хлорид алюминия растворяли в обычной питьевой воде для экспериментальных субъектов и вводили перорально в 500 мг/кг на дозу, постоянно в течение одного месяца, и в то же время проводили поведенческие исследования. Бета-амилоидные пептиды (25-35) олигомеризовали и делали растворимыми согласно нормам изготовителя и вводили интрацеребровентрикулярными средствами при 100 пмоль в 5 мкл, в правое полушарие головного мозга.

Экспериментальные животные. Этические соображения.

In vivo эксперименты, соответствующие модели скополамина и алюминия, использовали крыс линии Wistar (самцов, 230-260 г), в то время как in vivo эксперименты, соответствующие модели бета-амилоида, использовали мышей линии OF-1 (самцов, 25-30 г). Все животные поступали из Национального центра разведения животных для лабораторных исследований (CENPALAB, Маябеке, Куба) и после их получения их подвергали адаптации к лабораторным условиям в течение 7 дней. Их выдерживали при чередующихся циклах 12-часов света и тьмы, при регулируемой температуре ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), 45-55% относительной влажности, и им давали воду и пищу свободно по требованию. Все поведенческие исследования проводили от 09:00 до 17:00 при регулируемых условиях уровней света и шума. Все процедуры с животными, записанные в этом исследовании, проводили согласно критериям, одобренным международным комитетом по обращению с лабораторными животными и согласно национальным нормам, установленным для экспериментов с животными.

Схема эксперимента

Протокол 1: Оценка влияния JM-20 на потерю памяти, вызванную скополамином

Нами было оценено протекторное действие трех доз JM-20 (2, 4 и 8 мг/кг) на процессы приобретения и закрепления краткосрочной и долгосрочной памяти, на которую влияли острое внутривентрикулярное введение скополамина. Для этой цели JM-20 вводили перед воздействием или процессом приобретения и закрепления памяти, как краткосрочной, так и долгосрочной памяти, в четырех независимых тестах.

В каждом тесте образовывали 6 экспериментальных групп субъектов, выбранных произвольно ($n=10$, на группу): здоровая контрольная группа (СМС и солевой раствор); JM-20 группа без повреждения (JM-20 8 мг/кг); группа скополамина (СМС и скополамин 1 мг/кг); группы JM-20-скополамин (JM-20 2 мг/кг и скополамин 1 мг/кг), (JM-20 4 мг/кг и скополамин 1 мг/кг) и (JM-20 8 мг/кг и скополамин 1 мг/кг).

Влияние на память оценивали тестом распознавания новых объектов и тестом с принудительным чередованием с лабиринтом, используя схемы эксперимента, подходящие для независимого исследования процесса приобретения и закрепления краткосрочной и долгосрочной памяти.

В конце поведенческих исследований нами были проведены различные *in vivo* исследования мозговой ткани. Нами было изучено влияние JM-20 на различные маркеры окислительного стресса, митохондриальную функцию, уровни активности фермента ацетилхолинэстеразы AchE и гистологические параметры нейронной и аксонной жизнеспособности в областях мозга, сильно вовлеченных в процессы запоминания и обучения.

Протокол 2: Оценка влияния JM-20 на потерю памяти, вызванную хлоридом алюминия

Нами было оценено протекторное действие двух доз JM-20 (2 и 8 мг/кг) на различные типы памяти, на которую влияли острым внутрибрюшинным введением скополамина. Для этой цели JM-20 вводили с 15 дня после начала введения хлорида алюминия (500 мг/кг) до конца поведенческих исследований. Нами было оценено влияние JM-20 и хлорида алюминия на три типа памяти: пространственную память по тесту водного лабиринта Морриса и тесту в Т-образном лабиринте; распознавание нового путем теста распознавания новых объектов; и эмоционально-ассоциативную память путем теста на пассивное избегание.

Было сформировано 5 экспериментальных групп из произвольно выбранных субъектов (n=10, на группу): здоровая контрольная группа (СМС и вода); группа JM-20- без повреждения (JM-20 8 мг/кг и вода); группа алюминия (СМС и хлорид алюминия 500 мг/кг); группы JM-20-алюминий (JM-20 2 мг/кг и алюминий 500 мг/кг) и (JM-20 8мг/кг и алюминий 500 мг/кг).

В конце поведенческих исследований нами были проведены различные *in vivo* исследования мозговой ткани. Нами было изучено влияние JM-20 на различные маркеры окислительного стресса, митохондриальную функцию и уровни активности фермента ацетилхолинэстеразы AchE

Протокол 3: Оценка влияния JM-20 на повреждение, вызванное олигомерами пептида бета-амилоида 25-35

Изначально нами было оценено влияние JM-20 на жизнеспособность клеток линии клеток PC12, подвергнутых действию 1 мкМ концентрации олигомеров пептида бета-амилоида 25-35. В этом *in vitro* тесте оценивали влияние 3 концентраций JM-20 (3,125, 6,25 и 12,5 мкМ), растворенного в диметилсульфоксиде (DMSO). Сформировали 6 экспериментальных групп: группа необработанного контроля (NT); группа среды (DMSO); группа бета-амилоида (AP 1 мкМ); группы JM-20-бета-амилоида (JM-20 3,125+AP 1 мкМ), (JM-20 6,25 + AP 1 мкМ) и (JM-20 12,5 + AP 1 мкМ).

Затем проводили *in vivo* исследования на мышах линии OF-1. Нами было оценено влияние JM-20 на потерю памяти, вызванную олигомерами бета-амилоида, вводимого через 7 дней после интрацеребровентрикулярного введения AP (100 пмоль) в течение 10 дней, перорально в 10 и 30 мг/кг дозах. Нами было сформировано 5 экспериментальных групп: группа здорового контроля (холостой); группа JM-20 без повреждения (холостой + JM-20 30 мг/кг); группа бета-амилоида (AP 100 пмоль + СМС); группы JM-20-бета-амилоида (JM-20 10 мг/кг + AP 100 пмоль) и (JM-20 30 мг/кг + AP 100 пмоль).

Поведенческие исследования

Y-лабиринт. Спонтанное чередование

Влияние JM-20 на пространственную память оценивали при помощи теста в Y-образном лабиринте с принудительным чередованием (20). Лабиринт строили из пластмассы с тремя рукавами (55 x 20 x 20 см) под углом 120° на центральной платформе.

Тест проводили в две сессии. На первом этапе обучения мы проводили тренировочную фазу, в ходе которой каждую крысу помещали на центральную платформу и позволяли свободно исследовать рукава (А и С) лабиринта в течение 10 минут, в то время как третий рукав (В) был закрыт. Входы в каждый рукав считались входами в четыре концевые точки внутри любого рукава. Последовательность входов в рукава в течение 10 минут записывалась на видео для более позднего анализа. Этап оценки заключался в том, чтобы позволить крысам свободно исследовать рукава Y-лабиринта в течение 5 минут, включая тот, который был ранее закрыт. Последовательность входов в рукава записывали в течение 5 минут для последующего анализа. Этот тест оценивал число входов в новый рукав (В), где процент входов в этот рукав был прямо пропорциональным лучшей памяти у исследуемых животных. Процент правильных входов в рукав В рассчитывали на основе пропорции чередований, проводимых из всех возможных чередований, как показано в следующем уравнении: $\% \text{ правильных входов} = (\text{число входов в В}) / (\text{общее число входов в три рукава}) \times 100$. После каждого теста лабиринт очищали 40% раствором этанола для снижения существования обонятельных меток.

Распознавание объекта

Влияние JM-20 на память при распознавании новых объектов оценивали тестом на распознавание объекта. Этот тест проводили на открытом поле 2 последовательных дня. В первый день животные приспосабливались к полю, им позволяли исследовать бокс в течение 3 минут, в двух секциях. Во второй день тренировку проводили с оценкой обучения на 2 этапах по 5 минут каждый, затем рассматривались как тренировка (Е) и фаза тестирования (Р) соответственно. Во время стадии Е крысам были представлены 2 идентичных объекта, называемых знакомыми (F) объектами. Через 30 минут началась стадия Р, и крыс подвергали воздействию знакомого объекта F и нового объекта (N). Тесты записывали для анализа исследования объектов, определяемых временем исследования, проведенного каждым животным для каждого объекта. Скорости распознавания между объектами F и N вычислялись как $ID = (N - F) / (N + F)$.

Водный лабиринт Морриса

Тест в водном лабиринте Морриса проводили, как описано в «Vorhees y Williams» (21) с несколькими модификациями, в круглом резервуаре (1,52 м в диаметре, 0,60 м в глубину). Проводили 5 дней обучения, по 4 секции в день и на 6-й день оценивали обучение. Животные должны были научиться находить погруженную платформу, закрепленную в неизменном положении, во всех секциях тренировки. Несколько внешних ключей помещали и сохраняли в фиксированном положении во время всего эксперимента. На каждой тренировочной сессии животных помещали в воду, мордой к стенке резервуара, на одном из 4 мест выхода, пока они не находили платформу в течение максимального времени 1 минуты. В день оценки платформу удаляли. Нами количественно была определена задержка побега (время, потраченное животным на нахождение платформы) в учебных испытаниях, время, в течение которого животное оставалось в квадранте платформы во время теста для оценки обучения и расстояния до тех пор, пока не было найдено место платформы.

Пассивное избегание

Тест на пассивное избегание проводился на основе методологии, описанной Kohara и сотрудниками (22), с некоторыми изменениями. Мы использовали оборудование для пассивного уклонения (UGO Basile), состоящее из 2 камер, которые были освещены (30 x 30 x 30 см) и находились в темноте (10 x 20 x 12 см), соединенные дверью доступа в виде гильотины. Темная камера была оборудована электрической цепью.

Тест проводился в 2 этапа в течение 2 последовательных дней. В первый день каждую крысу помещали в освещенную камеру на 10 секунд, затем дверь между камерами открывали и крысе позволяли свободно перемещаться в течение максимального времени 90 секунд. Как только

крыса вошла в темную камеру, дверца доступа была закрыта, и крыса получила электрический заряд 1 мА в течение 5 секунд.

Во второй день латентность входа в темную камеру измерялась в течение максимального времени 300 секунд.

Изучение митохондриальной функции

Выделение церебральных митохондрий

Митохондрии выделяли дифференциальной центрифугой. Животных умерщвляли обезглавливанием и их мозг немедленно удаляли, нарезали в 50 мл изолирующего буфера, содержащего сахарозу 75 ммоль/л, EGTA 1 ммоль/л, маннит 225 ммоль/л, BSA 0,1% и HEPES-KOH 10 ммоль/л, pH 7,2, 4 °C и гомогенизировали в Potter-Elvehjen. Полученную таким образом суспензию центрифугировали при 2000 g в течение 3 минут и плавающее вещество центрифугировали при 12000 g в течение 8 минут. Осадок повторно суспендировали в 10 мл изолирующего буфера, также содержащего 20 мкл дигитонина при 10 %, и его центрифугировали при 12000 g в течение 10 минут. Митохондриальный осадок суспендировали в изолирующем буфере без EGTA и его центрифугировали при 12000 g в течение 10 минут, плавающее вещество удаляли и его осторожно промывали изолирующим буфером без EGTA. Метод микроуровня использовался для определения концентрации белков с использованием альбуминов бычьей сыворотки в стандартной схеме (Mirandola et al., 2010).

Митохондрии инкубировали в среде KCl 130 ммоль/л, MgCl₂ 1 ммоль/л и HEPES-KOH, фосфат 2 ммоль/л, pH 7,4. Митохондрии (1 мг белка/мл) активировали 5 ммоль/л ротенона и 2,5 мкмоль/л сукцината калия.

Митохондриальный мембранный потенциал

Потенциал митохондриальной мембраны определяли с использованием флуоресцентного спектрофотометра POLARstar Omega (Германия) и использовали флуоресцентный маркер сафранина O (10 мкМ) в флуоресцентном спектрофотометре POLARstar Omega (Германия) при 495/586 нм (возбуждение/эмиссия).

Набухание митохондрий

Набухание митохондрий контролировалось уменьшением видимого поглощения при 540 нм суспензии митохондрий, инкубированных в стандартной среде, в присутствии Ca²⁺ + 200 мкмоль/л и с использованием флуоресцентного спектрофотометра POLARstar Omega (Германия).

Получение реактивных частиц кислорода

Реактивные частицы кислорода (ROS) определяли с помощью спектрофлуориметрии с использованием Amplex red (Molecular Probes, Орегон, Юджин) в качестве флуоресцентного маркера и 1 мкл/мл пероксидазы хрена при 563/587 нм (возбуждение/эмиссия).

Подготовка мозговой ткани для тестов на фермент и окислительно-восстановительное состояние

Крыс умерщвляли обезглавливанием; их головной мозг удаляли и быстро разрезали, чтобы отделить 2 области, гиппокамп и префронтальную кору головного мозга обоих полушарий (23). Эти области гомогенизировали в буферном растворе фосфата натрия (0,1 мМ, pH 7,4: NaCl 0,13 М, KCl 0,0027 М, KH₂PO₄ 136,04 М, Na₂HPO₄ 0,0016 М) в пропорции 1:10 (p: v) и их центрифугировали при 6000 g в течение 20 минут в центрифуге Эппендорфа (Германия, 5424R). Соотношения гомогената мозговых структур сохраняли при -80°C до тех пор, пока их не использованы. Их

концентрацию белка определяли методом Лоури (24) в POLARstar Omega (Германия), используя эталон из альбумина бычьей сыворотки.

Активность ацетилхолинэстеразы (AChE)

Активность фермента AChE, присутствующего в гомогенате экстрагированного гиппокампа и префронтальной коры, измеряли спектрофотометрически с использованием метода, описанного Ellman (25) с небольшими изменениями (26). Испытание проводилось на 96-луночной планшете с конечным объемом 200 мкл. Реакционная среда содержала 140 мкл реагента Элмана, 50 мкл гомогената и 10 мкл 20 мМ раствора йодата ацетилтиохола (AcSCh), и ее инкубировали в течение 1 минуты при 37 ° С. Поглощение считывали при 405 нм в течение 20 минут с интервалом в 1 минуту в спектрофотометре POLARstar Omega (Германия). Ферментативную активность рассчитывали и выражали в виде мкмоль гидролизованного (AcSCh) в течение одной минуты на мг белка.

Изучение параметров окислительно-восстановительного состояния и окислительного повреждения

Активность супероксиддисмутазы (SOD)

Активность фермента SOD определяли с использованием метода окисления пирогаллола (27). Смесь реагентов состояла из раствора 2,8 мл Tris 0,2 М - HCl 0,2 М (pH 8,2), 0,05 мл ЭДТА 60 мМ, 0,1 мл гомогената и 0,05 мл раствора пирогаллола 7,37 мМ. Поглощение считывали при 420 нм в течение 1 минуты в спектрофотометре POLARstar Omega (Германия). Результаты были выражены как единицы активности фермента на мг белка, учитывая 1 единицу активности фермента как количество фермента, катализирующего превращение 1 мкмоль субстрата за одну минуту.

Активность каталазы (CAT)

Активность CAT-ферментов определяли на основе разложения перекиси водорода (H_2O_2) (28). Смесь реагентов состояла из 0,9 мл фосфатного буфера (pH 7,0), 0,1 мл гомогената мозговой ткани и 0,5 мл H_2O_2 (50 мМ). Поглощение считывали при 240 нм, на 10 и 70 секундах, в флуоресцентном спектрофотометре POLARstar Omega (Германия). Результаты выражали в мкмоль H_2O_2 , разложившегося за минуту на мг белка.

Сниженные уровни глутатиона (GSH)

Уровни GSH устанавливали, следуя методике, описанной Ellman (29), с некоторыми изменениями.

В лоток добавляли 0,375 мл фосфатного буфера (50 мМ, pH 8,0), 0,1 мл гомогената и 0,025 мл раствора 5,5'-дитио-бис-нитробензойной кислоты (OTNB)/ацетона (0,6 мМ). Поглощение считывали при 412 нм в спектрофотометре POLARstar Omega (Германия). Результаты рассчитывали при помощи коэффициента молярной экстинкции полученного хромофора ($1,36 \times 10^4$ (моль/л) $^{-1} \text{см}^{-1}$). Результаты выражали как нмоль GSH на мг белка.

Уровни перокисления липидов

Уровни перокисления липидов определяли обнаружением малонового диальдегида (MDA), образованного по реакции с тиобарбитуровой кислотой (30). Реагентную среду формировали с помощью 350 мкл смеси трихлоруксусной кислоты: тиобарбитуровой мочевиной кислоты: хлоргидрической кислоты, 100 мкл гомогената мозговой ткани и 50 мкл дитербутилгидрокситолуола (BHT). Смесь гомогенизировали в вибросмесителе TALBOYS (США) и помещали в течение 5 минут на водяную баню с термостатом Grant OLS200 (США) при 100°C. Затем его центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут в центрифуге Eppendorf (Германия, 5424R). MDA, образованный как продукт перекисного окисления липидов в мозговой ткани, реагирует с тиобарбитуровой мочевиной кислотой и дает окрашенное соединение, которое

было определено спектрофотометрией при 535 нм на флуоресцентном спектрофотометре POLARstar Omega (Германия). Концентрацию МОА рассчитывали, принимая во внимание коэффициент молярной экстинкции полученного окрашенного соединения ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и в зависимости от следующего уравнения:

$$C = \frac{D.O}{1,56} \times 10^4 \text{ нМ}$$

1,56,

где С представят собой концентрацию МОА, которую надо определить, а D.O. представляет собой обнаруженное поглощение. Результаты выражали как наноли МОА на мг белка.

Гистологическое исследование

Гистологическая оценка поражений, вызванных острым внутрибрюшинным введением скополамина, проводилась на участках гиппокампа и префронтальной коры головного мозга. Нами был использован Paxinos and Watson Atlas (31) с анатомическим описанием головного мозга крысы, чтобы идентифицировать каждую область головного мозга, и они были обработаны растворами гематоксилина и эозина (HE) в отделах коры толщиной 4 мкм, всегда занимая первые три разреза каждой области. Оба полушария наблюдали в оптическом микроскопе Leica (Microsystems, Германия). Повреждение нейронов оценивали в зонах CA1, CA2, CA3 и зубчатой извилине гиппокампа, и атрофия, ядерный пикноз, темная окраска цитоплазмы или отсутствие нейронов считались маркерами дегенерации. Кроме того, мы рассчитали повреждение аксонов, в частности, исходя из появления частично или полностью демиелинизированных аксонов, атрофии аксона, и выражали его в процентах от общего количества аксонов, присутствующих в каждом микроскопическом препарате или в каждой исследуемой области. Проводя анализ гистологического повреждения на уровне префронтальной коры, мы подсчитали среднее число нейронов и аксонов, пораженных в трех фиксированных областях каждого полушария головного мозга, и выражали его как процент поврежденных нейронов/аксонов по сравнению с общим количеством в каждой области.

Статистический анализ

Для статистической обработки и анализа полученных результатов мы использовали программу GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., США). Данные были выражены как среднее $\pm$ ЕЕМ (стандартная средняя ошибка), и мы проверили его нормальность и гомоскедастичность. Проводился однофакторный вариационный анализ (ANOVA), а затем тест Таки для множественных сравнений для сравнения между различными экспериментальными группами. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

Результаты показаны на Фигурах 9-14.

Сосудистая деменция

В качестве модели сосудистой деменции животные (самцы швейцарских мышей-альбиносов) были подвергнуты преходящей окклюзии общих сонных артерий в течение 20 минут, а нарушение когнитивных функций было оценено с помощью теста в водном лабиринте Морриса.

Результаты показаны на Фигуре 15.

Односторонние повреждения компактной части черного вещества при помощи инъекции 6-гидроксидопамина

Материалы и способы

Экспериментальные животные

Использовали взрослых самцов крыс линии Wistar, весом от 200 до 250 граммов в начале эксперимента, поступающих из Национального центра разведения животных для лабораторных исследований (CENPALAB), Гавана, Куба. Животных содержали в Центре исследований и разработки лекарственных средств (CIDEM) в пластиковых просвечивающих ящиках при средней температуре 23°C ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), с питанием и водоснабжением по желанию и 12-часовыми периодами света и темноты.

Этические соображения

В этом исследовании соблюдались нормы, установленные в кодексе этики для экспериментов с животными. Мы гарантировали генетическую достоверность животных, приобретая животных в признанных центрах разведения. Эта процедура позволяет избежать использования генетически измененных животных. С биологической точки зрения важность генетического качества исследований заключается в том, что результаты эксперимента могут быть воспроизведены в любом другом месте, где они могут быть повторены, и с этической точки зрения он обеспечивает наименьшее количество животных, которые необходимо использовать.

Во время исследования животные содержались в лучших условиях проживания. Их выдерживали при температуре 23°C, тем самым, в диапазоне обязательств, установленном для тропических зон ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Контроль температуры имеет важное значение, если учесть, что высокие температуры вызывают стресс у животных, а температура более 38°C может привести к их смерти. Периоды света и темноты, которым они подвергались, длились 12 часов, поскольку фотопериодичность непосредственно и/или косвенно регулирует циркадные, биохимические и гормональные ритмы.

Введение соединения

JM-20 вводили в 3 различных дозах: 10, 20 и 40 мг/кг, через 24 часа после индуцирования повреждения и ежедневно в течение 7 дней. Соединение получали в карбоксиметилцеллюлозе (СМС) при 0,05%, внутрижелудочно канюлей. Было 5 экспериментальных групп: Группа I (среда/солевой раствор с аскорбиновой кислотой, $n=6$), группа II (животные, на которых действовали 6-OHDA, $n=8$), группа III (животные, на которых действовали 6-OHDA и которых совместно лечили 10 мг/кг JM-20, $n=8$), группа IV (животные, на которых действовали 6-OHDA и которых совместно лечили 20 мг/кг JM-20, $n=8$) и группа V (животные, на которых действовали 6-OHDA которых совместно лечили 40 мг/кг JM-20 $n=8$). Все поведенческие испытания проводили на 7 день.

Обработка данных

Статистические анализы проводили при помощи пакета GraphPadPrism Version.5.01.2007. Результаты показали, что средняя $\pm$ SEM процента жизнеспособности по сравнению с клетками необработанного контроля. Во всех случаях вариационный анализ проводили (OneWay ANOVA) с последующим тестом Даннета (GraphPadPrism 5) для определения значимой разницы с уровнем значимости $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) и $p < 0,001$ (***) относительно контроля, используемого в эксперименте. Чтобы сравнить все значения, полученные в эксперименте, с различными контролями и друг относительно друга, мы провели тест Таки (GraphPadPrism 5) с уровнем значимости $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) и $p < 0,001$ (***)

Методы поражения в экспериментальных моделях, предназначенных для крыс

Односторонние повреждения черной субстанции при помощи инъекции 6-гидроксидопамина у крыс

Для целей односторонней дофаминергической денервации полосатого тела (правого полушария) крыс анестезировали хлоралгидратом [0,4 г/кг веса, внутрибрюшинно, Merck (Дармштадт, Германия)] и помещали в рамку, предназначенную для стереотаксической хирургии (Stoelting

Instruments, США), где им вводили в правую черную субстанцию физиологический раствор нейротоксина 6-OHDA-HBr (8 мкг/3 мкл, также содержащим 0,2 мг/мл аскорбиновой кислоты в качестве антиоксиданта) (Pavón Fuentes, Nancy (2007) Efecto de la inactivación de los receptores dopaminérgicos D2 y de la manipulación del núcleo subtalámico sobre la conducta motora en modelos de hemiparkinsonismo en roedores. Doctor en Ciencias de una Especialidad, Universidad de Ciencias Médicas de La Habana). Координаты были рассчитаны с учетом Брегмы как точки отсчета в соответствии с Paxinos and Watson Atlas [Paxinos,G. and Watson,C., The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd the Academic Press. New York, 1986], на который ссылаются в таблице 1.

Таблица 1. Стереотаксические координаты, выраженные в мм относительно Брегмы (за исключением DV ссылаясь на твердую мозговую оболочку/поверхность)

Координаты	
AP	-4,4 мм
ML	1,2 мм
DV	7,8 мм
Острая полоса	-2,4 мм под интерауральной линией

Когда уместно нейротоксин медленно вводили при скорости потока 1 мкл/мин с помощью шприца Манилтона (3 мкл), оставаясь на месте в течение 5 мин. после завершения инъекции.

IV. Поведенческие тесты

А. Проверка передних конечностей на асимметричность

В этом тесте крыс помещали внутри прозрачного акрилового цилиндра диаметром 20 см и высотой 30 см, что не позволяло животному достичь края. Цилиндрическая форма способствует врожденному поведению вертикального исследования стены их задними конечностями, когда крысы были помещены в место, которое они не знали. (Chan, H., Paur, H., Vernon, A.C., Zabarsky, V., Datla, K.P., Croucher, M.J., Dexter, D.T., 2010. Neuroprotection and functional recovery associated with decreased microglial activation following selective activation of mGluR2/3 receptors in a rodent model of Parkinson's disease. ParkinsonsDis.pii, 190450). После размещения животного количество прикосновений, сделанных животным обеими передними лапами, справа или слева, определяется количественно до 20 прикосновений животного к стене резервуара.

Животные, пораженные 6-OHDA с одной стороны, склонны использовать лапу, которая в меньшей степени подвержена поражению, в нашем случае - левая лапа. Процент асимметрии, представленной каждым животным, определяется количественно следующей формулой (Roof RL, Schielke GP, Ren X, Hall ED (2001) A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats. Stroke 32: 2648-2657).

$$(\% \text{ ипсилатеральных прикосновений}) - (\% \text{ прикосновений с другой стороны}) = (\% \text{ асимметрии})$$

Исследовательская активность

Для оценки вертикальной исследовательской активности животных мы использовали тест на исследовательскую активность; животное помещали в прозрачную клетку из плексигласа, 41 x 41 x 33 (h) см, (UGO BASILE, каталог MultipleActivityCage №47420. Вывод данных управляется 52050-04 пакетом программного обеспечения для сбора данных (на базе Windows®). Клетка поддерживается на прочном основании из черного плексигласа, который имеет 4 вертикальных стальных стержня со стальными канавками, так что горизонтальные / вертикальные системы обнаружения правильно прикреплены. Датчики представляют собой системы ИК-излучения, способные регистрировать движения животных по формам или, скорее, вертикальные исследования. Данные контролируются на компьютере. Животные помещаются в центр коробки, чтобы они могли исследовать ее. Коробка помещается в комнату, изолированную от исследователя и шума окружающей среды и с низким освещением, на 5 минут. Исследователь принимает количество раз, когда животное вертикально исследует стенки коробки, когда световые лучи датчика в коробке, прерываются (Cools, A. R., R. Brachten, D. Heeren, A. Willemsen, and B. Ellenbroek, 1990. Search after neurobiological profile of individual-specific features of Wistar rats. Brain Res. Bull. 24: 49-69). Результаты показаны на Фигуре 16.

Тоническая боль

Мы изучали влияние JM-20 (10, 20, 40 мг/кг, перорально) на поведение относительно боли в модели тонической боли (тест с 5% формалина) у крыс. (Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain-stem stimulation in rats and cats. Pain 1977;4:161-174).

Результаты показаны на Фигурах 17 А, 17 В и 18.

Невропатическая боль

Мы исследовали эффект JM-20 на модели постоянного стеноза седалищного нерва (CCI), модели NP (Bennett MI, Rayment C, Hjermstad M, Aass N, Caraceni A, Kaasa S. Prevalence and aetiology of neuropathic pain in cancer patients: A systematic review. Pain 2012; 153:359-365)

Результаты показаны на Фигурах 19-23.

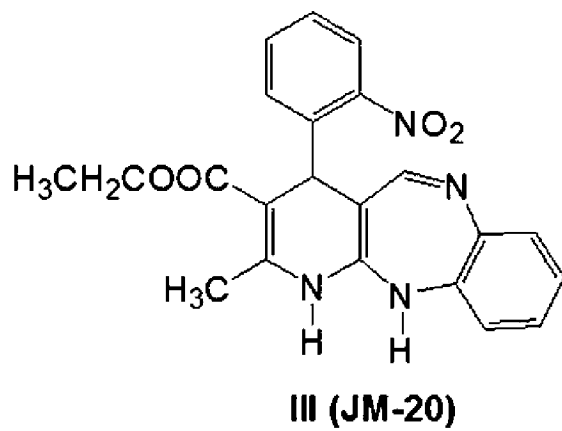
Вызванный каррагинаном перитонит

Впоследствии мы разработали различные эксперименты в модели индуцированного СА перитонита у грызунов, чтобы исследовать возможную противовоспалительную активность JM-20 в этих условиях.

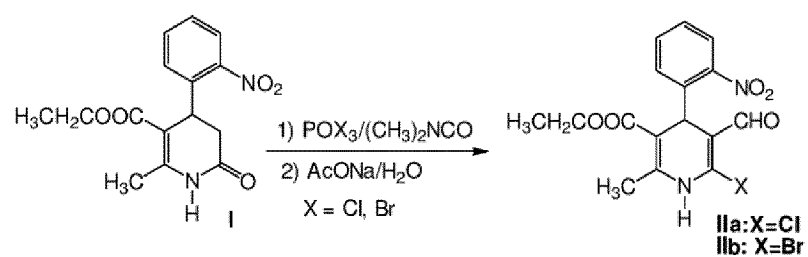
Результаты показаны на Фигурах 24 А-Е.

ФОРМУЛА ДЛЯ ПОДАЧИ ВЫДЕЛЕННОЙ ЗАЯВКИ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

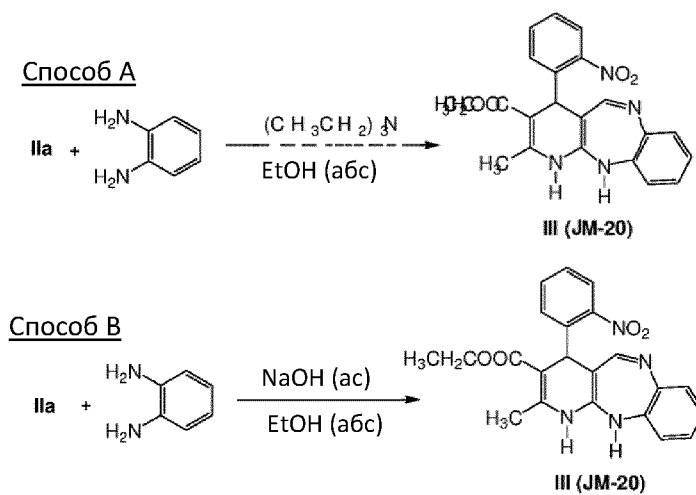
1. Применение соединения формулы



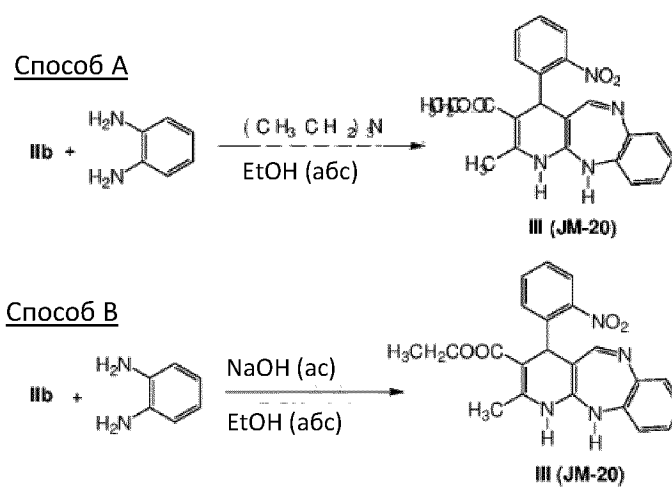
при лечении невропатической боли.



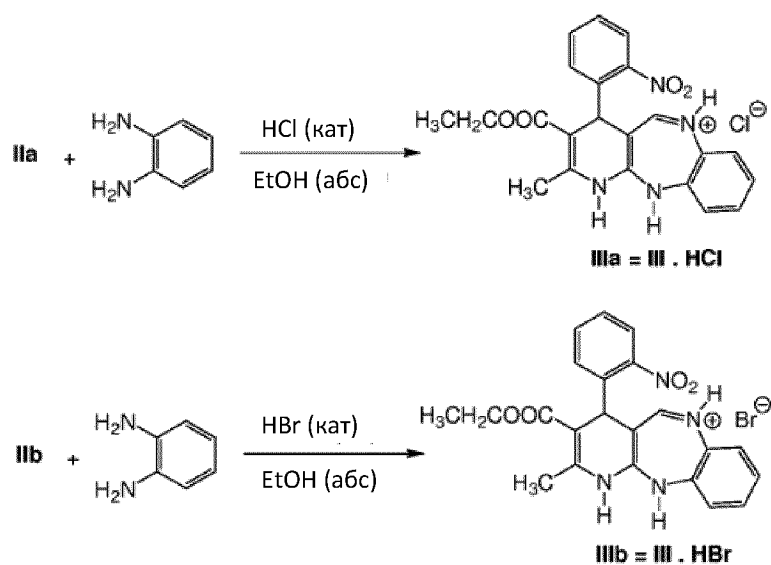
Фиг. 1. Схема получения IIa и IIb



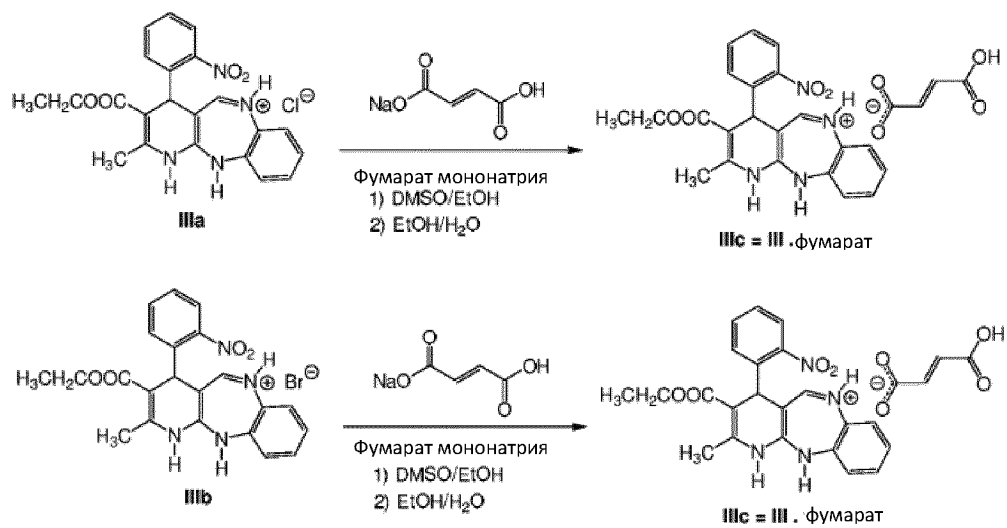
Фиг. 2.



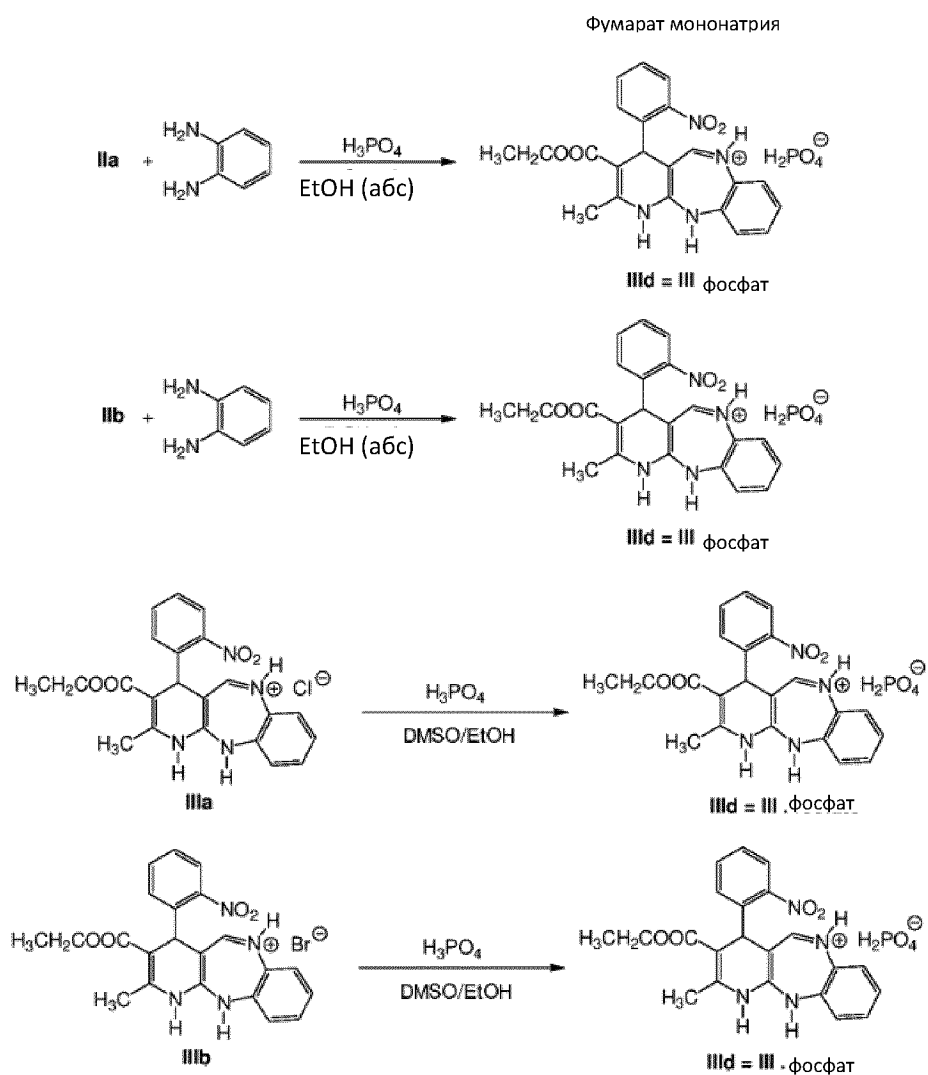
Фиг. 3.



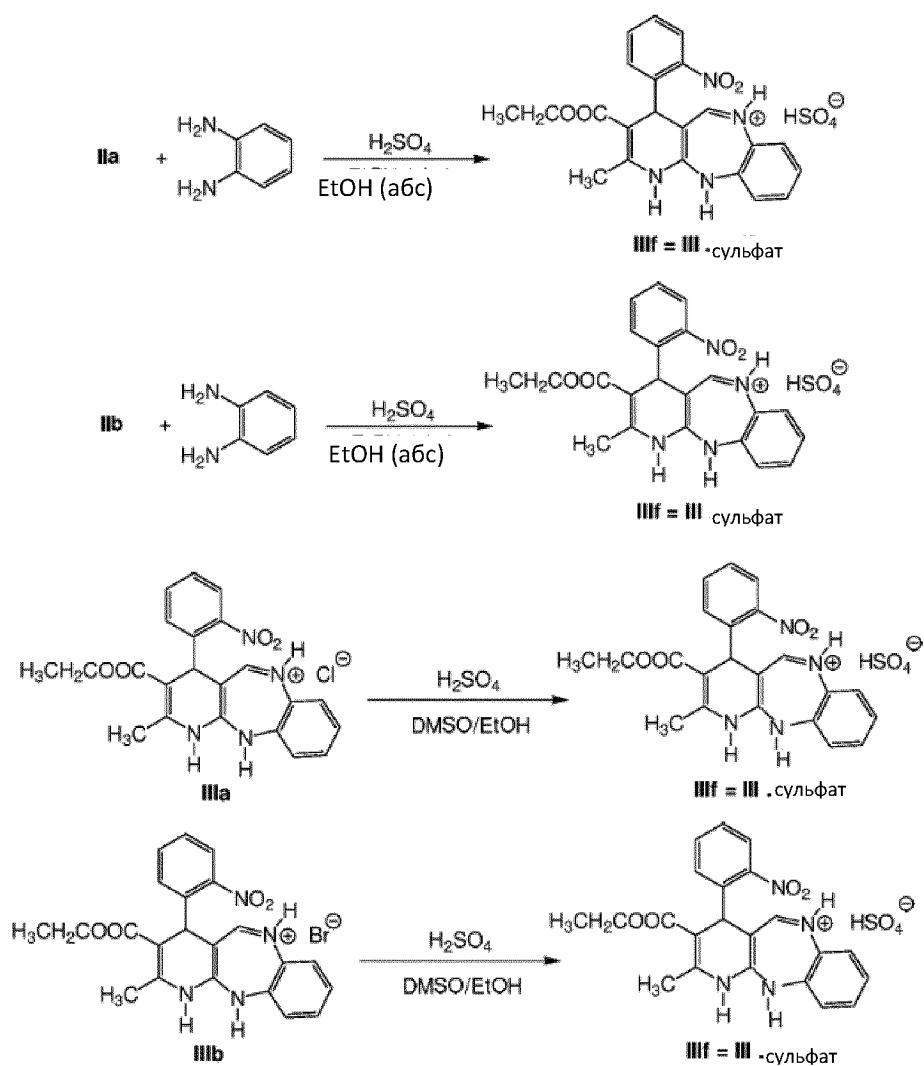
Фиг. 5. Схема получения соединения III и его галогенидов



Фиг. 6. Получение фумаратной соли из JM-20 (IIIc).

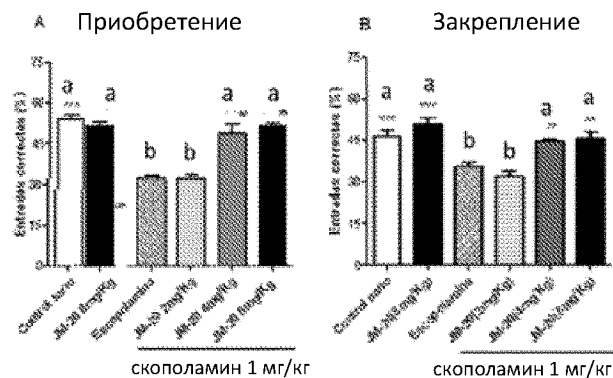


Фиг. 7. Получение фосфатной соли из JM-20 (III d).

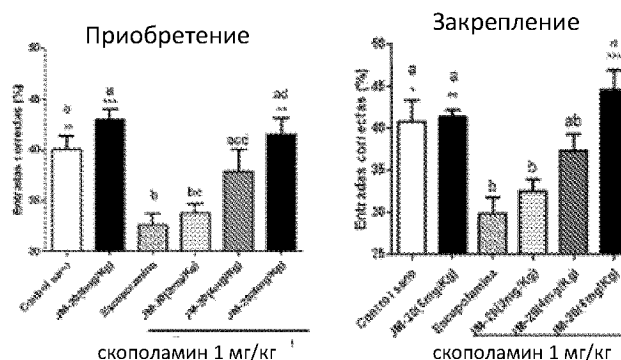


Фиг. 8. Получение сульфатной соли из JM-20 (III_f).

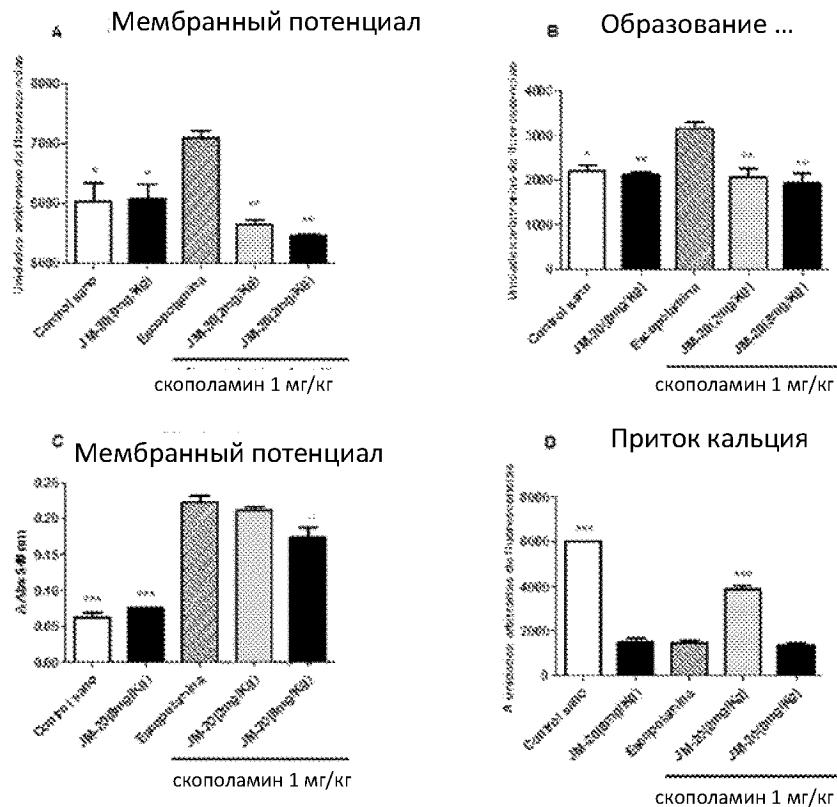
Краткосрочная память



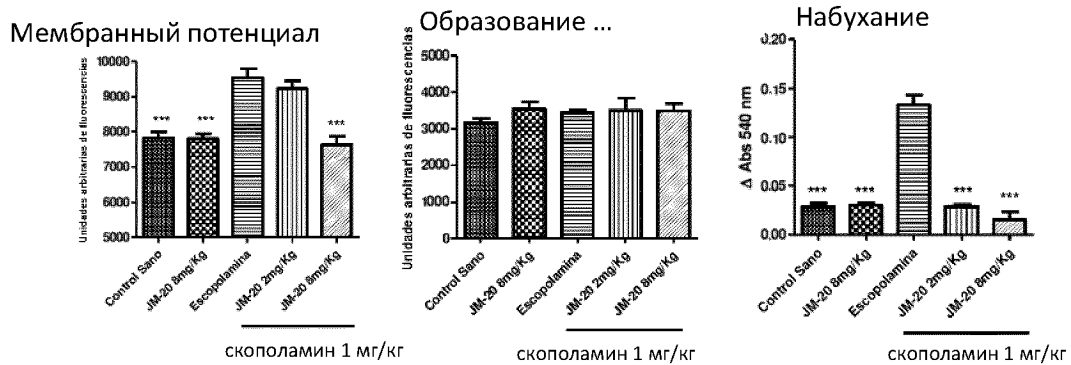
Долгосрочная память



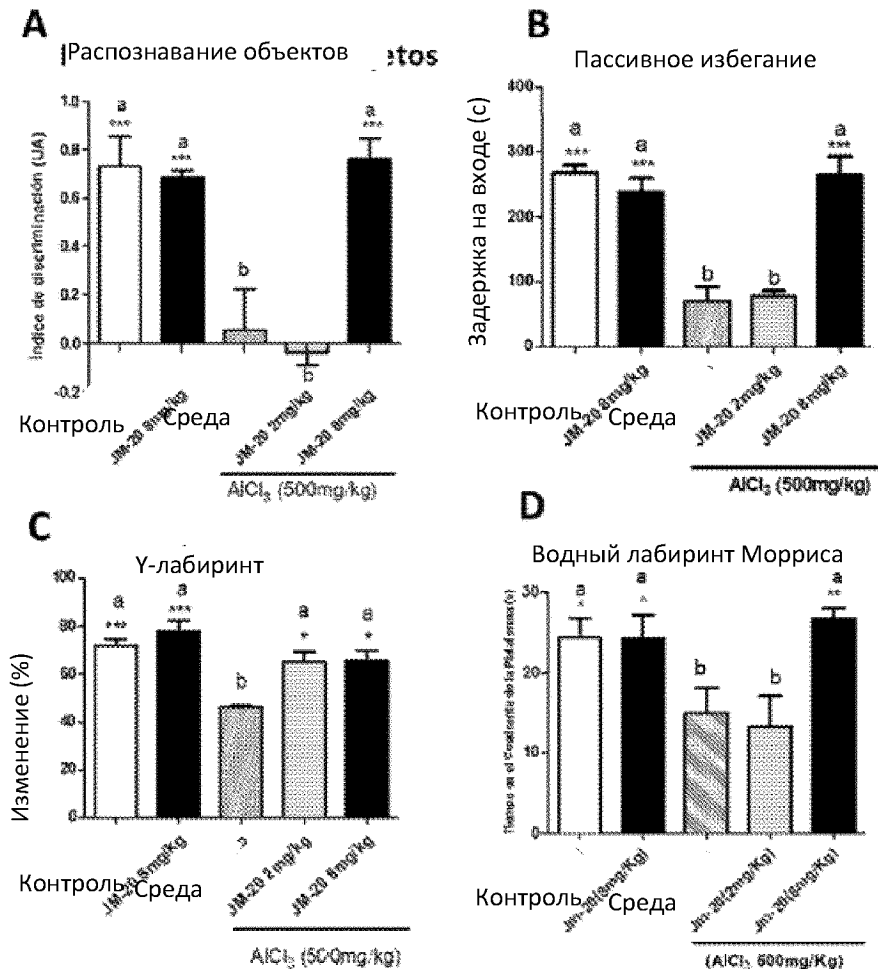
Фиг. 9: Влияние JM-20 на краткосрочную и долгосрочную пространственную память, в частности в процессах приобретения и закрепления. Данные выражены как среднее $\pm$ DE (n=7 на группу) процента спонтанного чередования. Для статистического анализа мы проводили множественные сравнительные тесты ANOVA и Таки. Различные буквы различают среди них для $p < 0,05$.



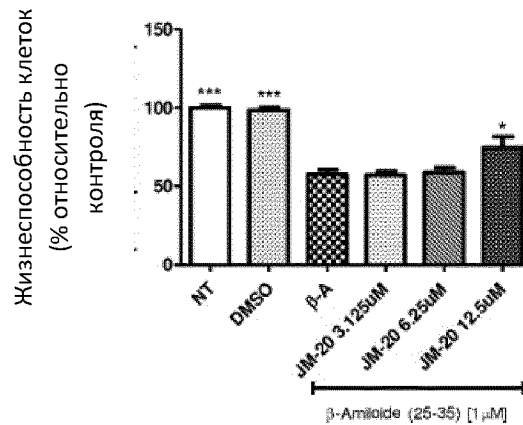
Фиг. 10: Влияние JM-20 на митохондриальную дисфункцию мозговой ткани у крыс, которых обработали скополомином. Различные дозы JM-20 вводили перорально за 1 час до введения скополамина. Митохондрии мозга выделяли через 1 час после введения скополамина, и мы оценивали мембранный потенциал (А), образование H₂O₂ (В), набухание митохондрий (С) и приток кальция в митохондриях (D). Полосы представляют среднее ± EEM (n = 10). Различные буквы показывают различия между группами: $p < 0,05$, при помощи ANOVA и после Таки. (А): ***, $p = 0,0009$, (В): **, $p = 0,0034$ относительно среды/скополамина 1 мг/кг группу, при помощи ANOVA и после Таки группа.



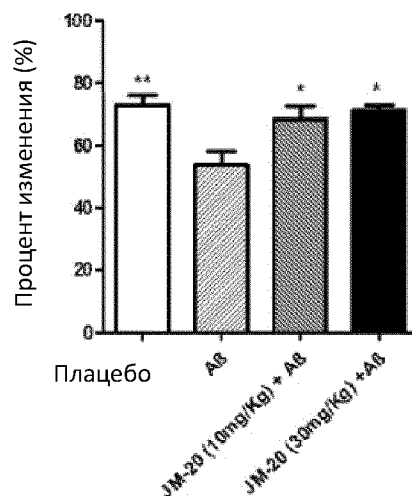
Фиг. 11: Влияние JM-20 на митохондриальную дисфункцию мозговой ткани у крыс, которых обработали скополамином. Различные дозы JM-20 вводили перорально за 1 час до введения скополамина. Митохондрии мозга выделяли через 1 час после введения скополамина, и мы оценивали мембранный потенциал (A), образование H_2O_2 (B) и набухание митохондрий (C). Полосы представляют среднее $\pm$ EEM ($n = 10$). ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$ и *, $p < 0,05$ относительно среды/скополамина 1 мг/кг группу, при помощи ANOVA и *post hoc* Таки группа.



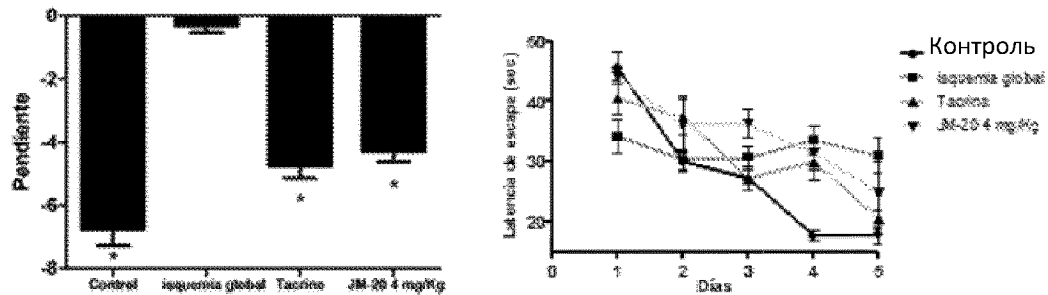
Фиг. 12: Влияние JM-20 на потерю различных типов памяти, индуцированную алюминием. А) Тест распознавания новых объектов, память распознавания новых объектов; В) Тест на пассивное избегание, эмоционально-ассоциативная память; С) Тест на Y-лабиринт, пространственная память; D) память ориентирования в пространстве водный лабиринт Морриса. Полосы представляют среднее $\pm$ EEM. Различные буквы показывают различия между группами: $p < 0,05$, при помощи ANOVA и после Таки. ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$ и *, $p < 0,05$ сравнение относительно группы, обработанной алюминием 500 мг/кг, при помощи ANOVA и после Таки группа.



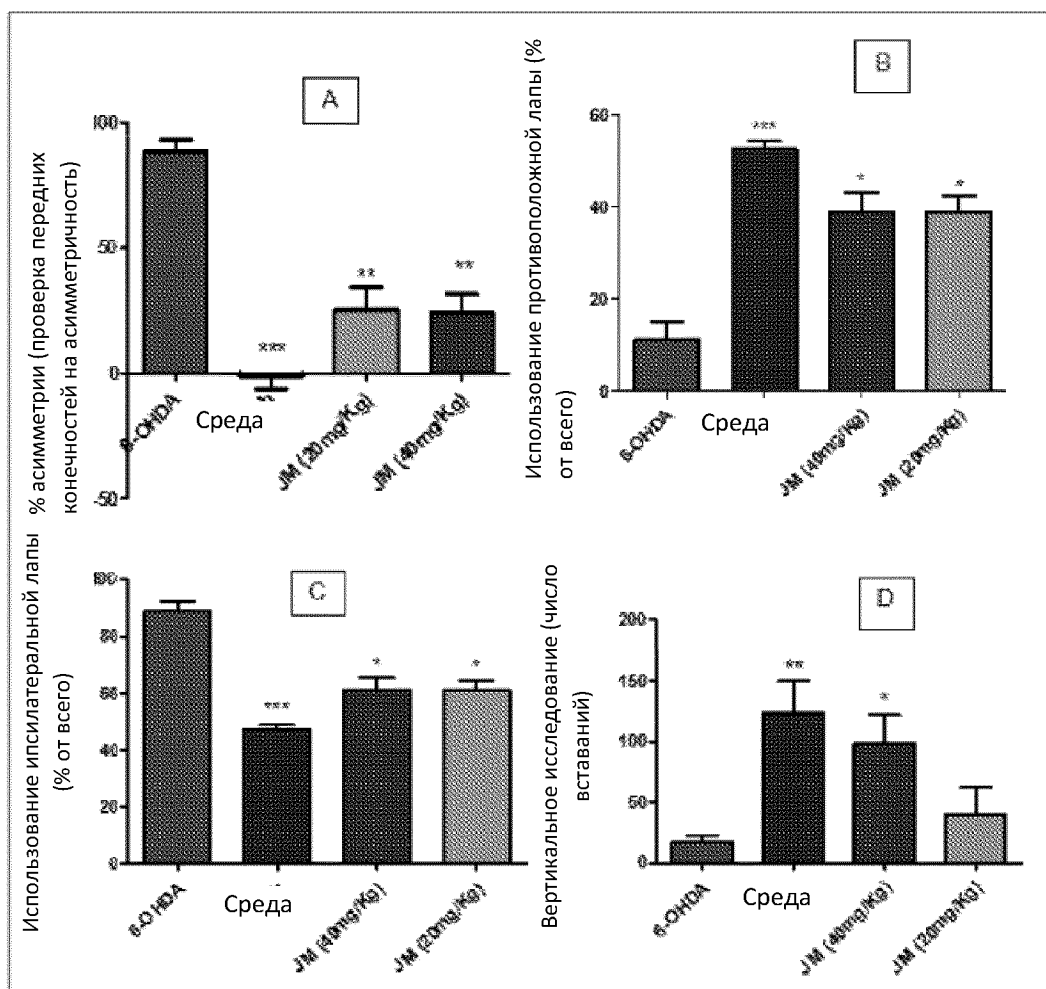
Фиг. 13: Влияние JM-20 на повреждение жизнеспособности клеток, получаемое ввиду олигомеров пептида бета-амилоид 25-35



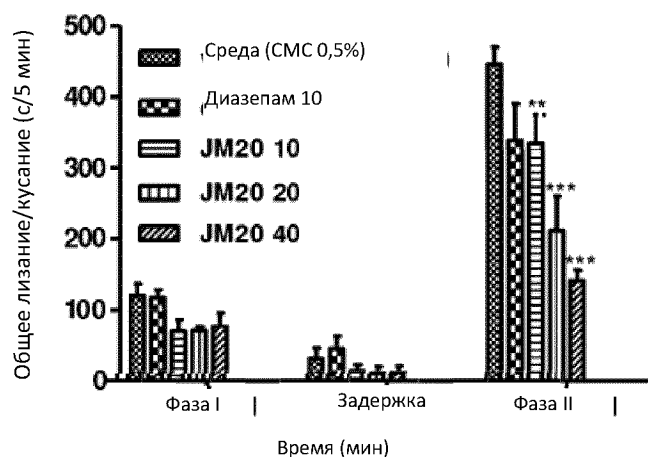
Фиг. 14. JM-20 возвращает потерю памяти, вызванную олигомерами пептида бета-амилоида 25-35 JM-20 вводили 7 дней после введения бета-амилоида. Полосы представляют среднее $\pm$ EEM; сравнение выполняли на группе, обработанной бета-амилоидом ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$ и *, $p < 0,05$ при помощи ANOVA и после Таки группа.



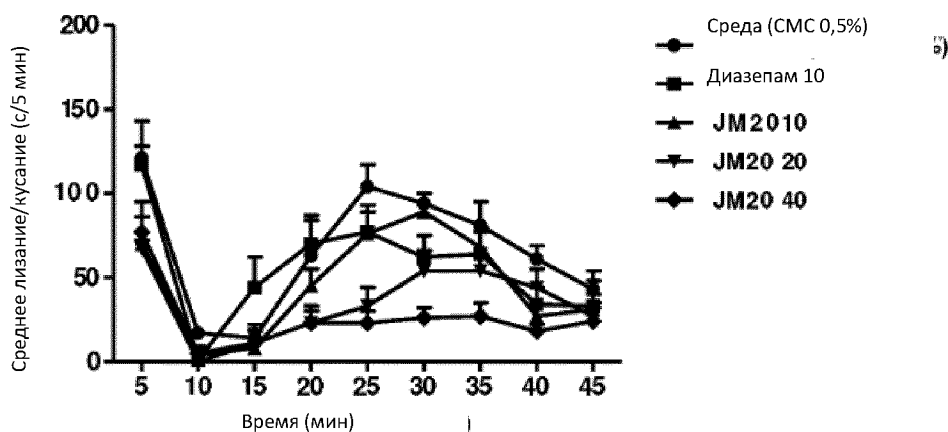
Фиг. 15: Влияние JM-20 на нарушение когнитивных функций, вызванное преходящей окклюзией общих сонных артерий крыс. Животным вводили перорально дозы 4 мг/кг, 1 после реперфузии. Данные выражены как среднее $\pm$ DE (n=8 на группу). Для статистического анализа мы проводили ANOVA и тесты множественного сравнения Таки, * $p < 0,01$, представляет значимую разницу относительно животных с ишемией без лечения.



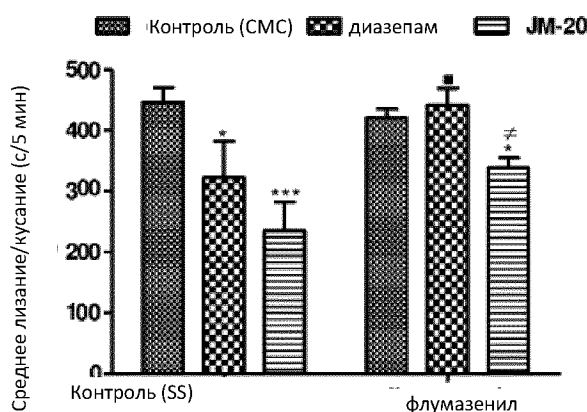
Фиг. 16: Нейропротекторное действие JM-20 на повреждение, вызванное 6-OHDA у самцов крыс линии Wistar через 7 дней лечения. (A) снижение % асимметрии (проверка передних конечностей на асимметричность), животных обрабатывали JM-20 что показало улучшение двигательных функций по сравнению с пораженными животными без лечения. (B) повышенное использование лапы, противоположной повреждению и (C) нормальные значения использования ипсилатеральной лапы (50%-), у пораженных животных и которых лечили обеими дозами JM-20 (40 и 20 мг/кг). (D) У животных, которых лечили JM-20, повышалась вертикального исследования, которое статистически отличалось для дозы 40 мг/кг относительно животных с повреждениями, которых не лечили.



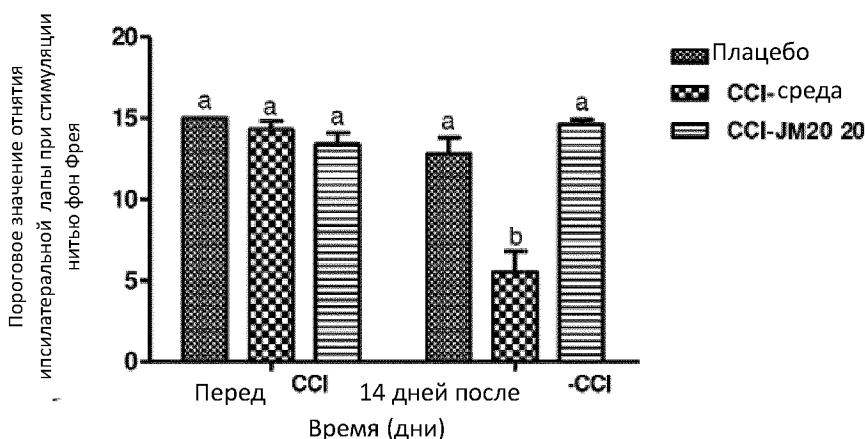
Фиг. 17А: Влияние JM-20 (10-40 мг/кг, 10 мл/кг, перорально), диазепам 10 мг/кг или среда (СМС, 0,05%) на поведение лизания/кусания после инъекции 5% формалина на подошвенной поверхности лапы крысы. Данные представлены как общее среднее времени лизания/кусания $\pm$ ЕЕМ на фазе I (0-5 мин), времени ожидания (5-15 мин) и фазе II (15-45 мин) или тест с формалином, $n=7$ на группу, *** $p<0,001$ представляет значительные различия относительно контрольной группы, которую лечили средой (ANOVA для одного пути с последующим тестом Даннетта).



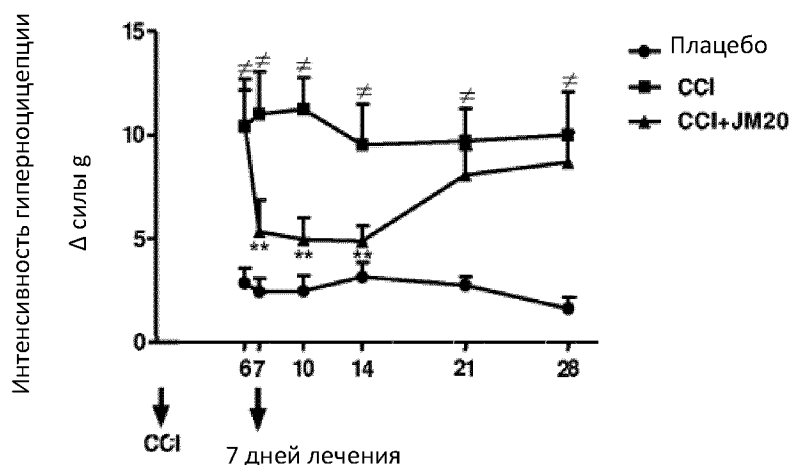
Фиг. 17В. Время влияния JM-20 (10-40 мг/кг, 10 мл/кг, перорально), диазепам 10 мг/кг или среда (СМС, 0,05%) на поведение лизания/кусания после инъекции 5% формалина на подошвенной поверхности лапы крысы. Данные представлены как среднее времени лизания/кусания (/5 мин/с) $\pm$ ЕЕМ в течение 45 минут теста, $n=7$ на группу.



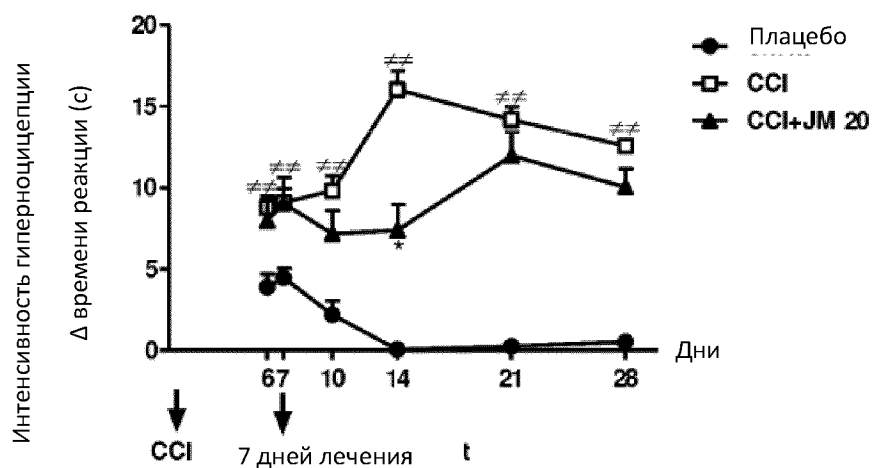
Фиг. 18: Влияние предварительной обработки животных флумазенилом (10 мг/кг, интраперитонеально) на антигиперноцицептивный эффект JM-20 на фазе II теста с 5% формалином. Каждая колонка представляла время реакции 6-10 животных на группу как среднее $\pm$ ЕЕМ, * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ представляет статистические различия между группами лечения и контроля (только среда) *** $P < 0,05$ представляет статистические различия между группами, обработанными диазепамом в присутствии или в отсутствие флумазенила, # $p < 0,05$ представляет статистические различия между группами, обработанными JM-20 в присутствии или в отсутствие флумазенила.



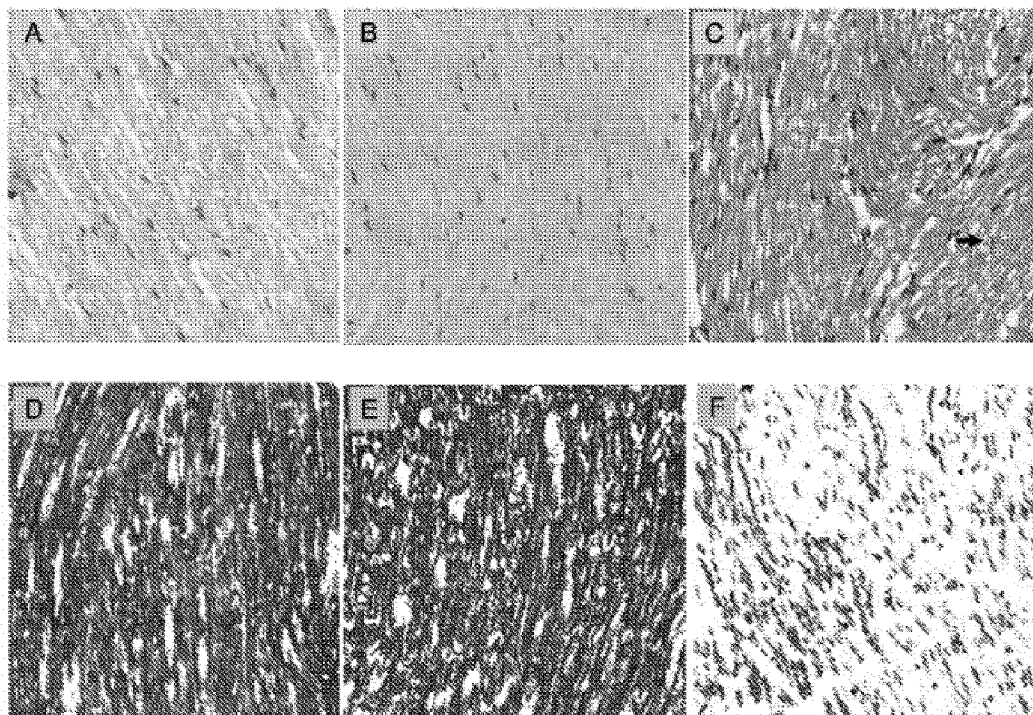
Фиг. 19: Влияние JM-20 (20 мг/кг, 10 мл/кг, перорально) или среды (СМС, 0,05%) на механическую аллодинию в ипсилатеральной лапе крыс CCI через 14 дней после хирургии, определенное измерением реакции отнятия лапы при стимуляции нитью фон Фрея. Данные представлены как среднее $\pm$ ЕЕМ 50% порогового значения реакции, $n=7$ на группу. Различные буквы представляют значимые различия между группами (ANOVA для одного пути с последующим критерием Бонферрони).



Фиг. 20: Влияние JM-20 (20 мг/кг, 10 мл/кг, перорально) или среды (СМС, 0,05%) на интенсивность механической гиперноцицепции ипсилатеральных лап крыс CCI, определенное измерением реакции отнятия лапы при стимуляции нитью фон Фрея. Данные представлены как среднее $\pm$ ЕЕМ разницы пороговых значений (b.) для вывода в граммах, рассчитанных на основе вычитания среднего трех измерений различных временных интервалов из среднего трех измерений времени О, $n=7$ на группу. ** $p<0,01$ представляет статистические различия относительно контрольной группы, которую лечили средой, # $p<0,05$ представляет статистические различия относительно группы холостой CCI (ANOVA для одного пути с последующим критерием Бонферрони).

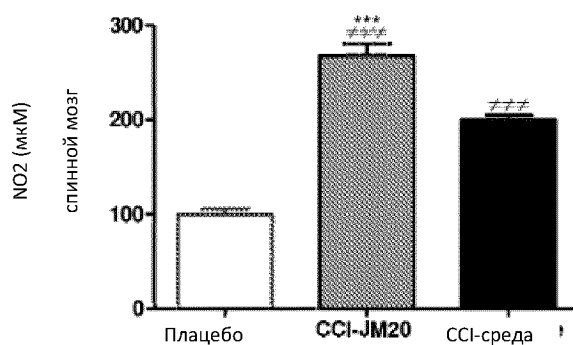


Фиг. 21. Влияние JM-20 (20 мг/кг, 10 мл/кг, перорально) или среды (СМС, 0,05%) на механическую гиперноцицепцию для постоянного давления на лапы путем модификации классического теста Рэндала-Селитто или SH Ferreira. Данные представлены как среднее $\pm$ EEM разницы (b.) времени реакции, рассчитанного вычитанием измерения различных временных интервалов из измерения времени 0, $n=7$ на группу $*p<0,05$ представляет статистические разницы относительно контрольной группы, которую лечили средой, $^{##}p<0.01$ представляет статистические разницы относительно группы холостой CCI (ANOVA для одного пути с последующим критерием Бонферрони).

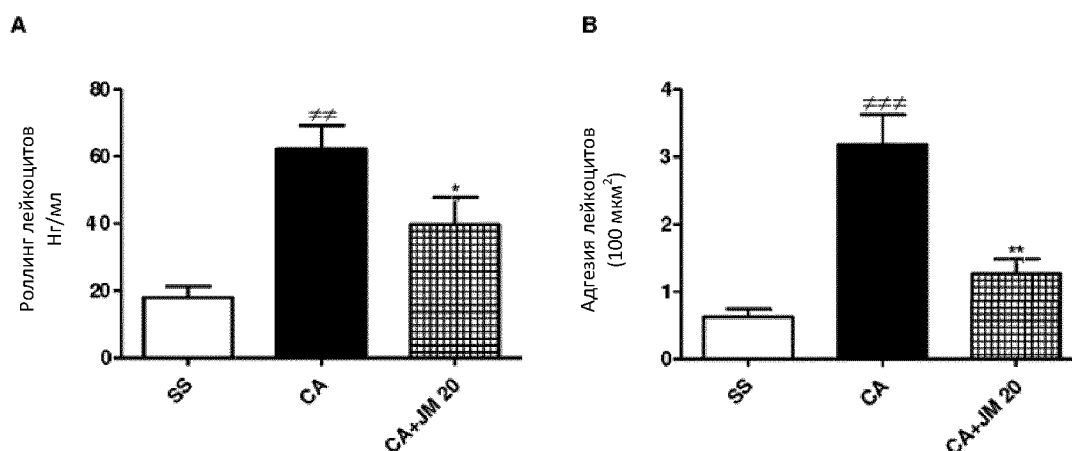


Фиг. 22: Влияние лечения при помощи JM-20 (20 мг/кг, перорально) с повторяющимися дозами в течение 7 дней, начиная на 7 день после CCI, на гистологические изменения, вызванные CCI (валлеровское перерождение) на 14 день после хирургии. А, В и С показывают продольные сечения седалищного нерва на 5 мм от повреждения на крысах CCI холостые, CCI, которых лечили JM-20, и лечили средой соответственно (окрашивание Н/Е). Мы можем наблюдать увеличение клеточности у животных CCI по сравнению с животными, у которых проводили хирургию с плацебо, в результате пролиферации клеток Шаванна и инфильтрации макрофагов и потери упорядоченного выравнивания аксонов, связанных с их миелиновой оболочкой, по сравнению с CCI с плацебо. Стрелка указывает на одну из многих камер переваривания клеток Шаванна, содержащих миелин овальный (красноватая овальная масса). D, E, F показывают срезы от одних и тех же животных, но они окрашены техникой luxol fast blue (LFB), специфической методикой для настойки миелина. В и Е: снижение дезорганизации нервных волокон, вызванных CCI, и увеличение количества

клеток и деградация миелиновых оболочек у животных, которых лечили JM-20, особенно этот последний эффект, указанный в Е.

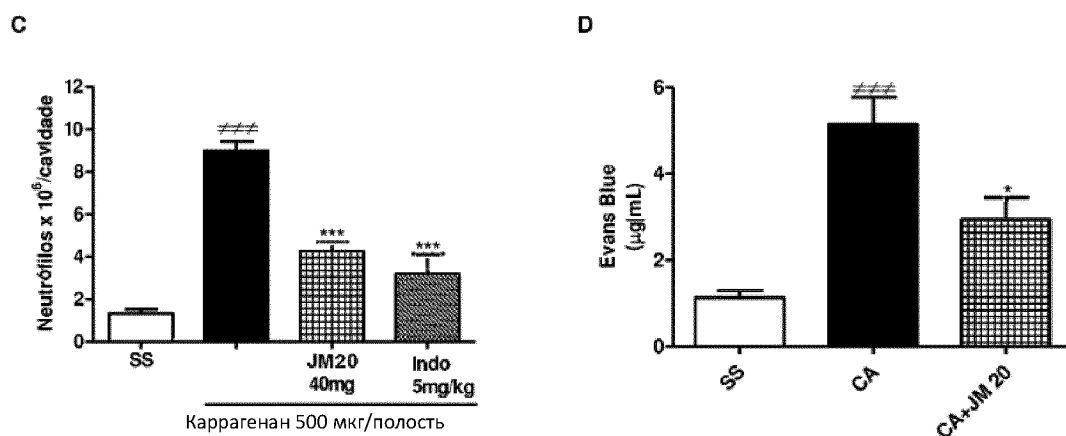


Фиг. 23: Влияние JM-20 (20 мг/кг, 110 мл/кг, перорально) или среды (СМС, 0,05%) на концентрации в спинном мозге нитратов в качестве индикатора концентраций оксида азота. Данные представлены как среднее $\pm$ ЕЕМ, $n=7$ на группу, $***p<0,001$ представляет статистические различия относительно контрольной группы, которую лечили средой, $###p<0,001$ представляет статистические различия относительно группы плацебо CCI (ANOVA для одного пути с последующим критерием Бонферрони).

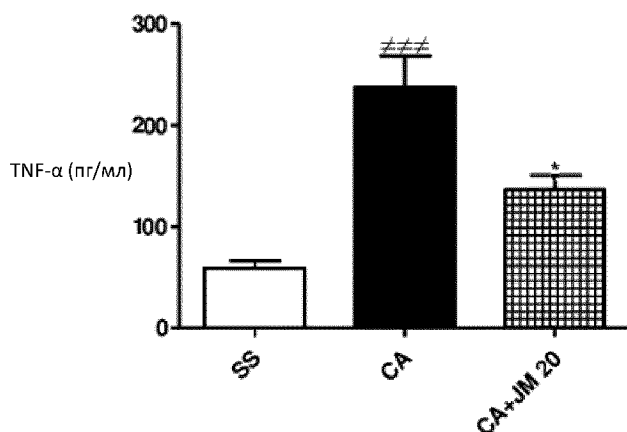


Фиг. 24: Влияние JM-20 (20 мг/кг, 110 мл/кг, перорально) или среды (СМС, 0,05%) на перитонеальный воспалительный ответ, вызванный каррагенаном (500 мкг/полость) у крыс. А. Роллинг лейкоцитов и В их адгезию к сосудистому эндотелию в брыжейке определяли прижизненным микроскопом через 4 часа после индукции воспаления. Данные представлены как среднее $\pm$ ЕЕМ, $n=7$ на группу, $*p<0,05$, $**p<0,01$ представляет статистические различия относительно контрольной группы, которую лечили средой, $###p<0,001$, $##p<0,01$ представляет статистические различия относительно контроля с внутрибрюшинным солевым раствором

(ANOVA для одного пути с последующим тестом Ньюмана-Кейлс или Бонферрони в каждом конкретном случае).



Фиг. 24. Влияние JM-20 (40 мг/кг, 110 мл/кг, перорально) или среды (СМС, 0,05%) на внутрибрюшинный воспалительный ответ, вызванный каррагенаном (500 мкг/полость) С. Миграция лейкоцитов к брюшинной полости и D. проницаемость сосудов (мкг/мл) определяли через 4 часа после СА. Данные I представлены как среднее $\pm$ ЕЕМ количества нейтрофилов/полость, $n=6$ на группу, $^*p<0,05$, $^{*}p<0,01$ представляет статистические различия относительно контрольной группы, которую лечили средой, $^{###}p<0,001$ представляет статистические различия относительно контроля с внутрибрюшинным солевым раствором (ANOVA для одного пути с последующим критерием Бонферрони).**



Фиг. 24 E: Влияние JM-20 (20 мг/кг, 110 мл/кг, перорально) или среды (СМС, 0,05%) на концентрации фактора некроза опухолей (TNF α) в перитонеальной жидкости через 4 часа после инфицированием каррагенаном. Данные I представлены как среднее $\pm$ ЕЕМ, $n=6$ на группу $^*p<0,05$ представляет статистические различия относительно контрольной группы, которую лечили средой, $^{###}p<0,05$ представляет статистические различия относительно контроля с внутрибрюшинным солевым раствором (ANOVA для одного пути с последующим критерием Бонферрони).

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference prueba	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/CU2017/050002	International filing date (<i>day/month/year</i>) 3 May 2017 (03-05-2017)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 4 May 2016 (04-05-2016)
Applicant UNIVERSIDAD DE LA HABANA		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.

☒

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

☒

the international application in the language in which it was filed

☐

a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐

This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☐

With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐

Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐

Unity of invention is lacking (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

☒

the text is approved as submitted by the applicant

☐

the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☒

the text is approved as submitted by the applicant

☐

the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____

☐

as suggested by the applicant

☐

as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure

☐

as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☒

none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CU2017/050002

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07D471/04
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CU 23 879 B1 (CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE MEDICAMENTOS. LABORATORIO) 19 April 2013 (2013-04-19) cited in the application page 5, paragraph Sixth; claim 1; compound JM20	1-11
A	----- WO 2009/137462 A2 (ENVIVO PHARMACEUTICALS INC [US]; METHYLGENE INC [CA]; ROGERS KATHRYN []) 12 November 2009 (2009-11-12) page 159; claims 1-96; example 17; compound 84a -----	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 July 2017

Date of mailing of the international search report

27/07/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sotoca Usina, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/CU2017/050002

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CU 23879	B1	19-04-2013	-----
WO 2009137462	A2	12-11-2009	US 2011288070 A1 24-11-2011
			US 2015080325 A1 19-03-2015
			US 2017000749 A1 05-01-2017
			WO 2009137462 A2 12-11-2009
