

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 042675

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.13

(21) Номер заявки
202190717

(22) Дата подачи заявки
2019.09.13

(51) Int. Cl. C07D 471/04 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61P 29/02 (2006.01)

(54) ЛИГАНД РЕЦЕПТОРА ГАМК-А

(31) 18194297.0

(32) 2018.09.13

(33) EP

(43) 2021.09.22

(86) PCT/EP2019/074465

(87) WO 2020/053377 2020.03.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САНИОНА А/С (DK)

(72) Изобретатель:
Ларсен Янус С., Амруткар Дипак,
Якобсен Томас Амос, Дюринг Тино,
Нильсен Карин Сандагер (DK)

(74) Представитель:
Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)

(56) WO-A1-2007110374

(57) Изобретение относится к 2-(3-(3-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)фенил)-3Н-имидазо[4,5-
b]пиридин-6-ил)пропан-2-олу, который полезен в качестве модулятора рецептора ГАМК (гамма-
аминомасляная кислота). В одном варианте осуществления указанное соединение эффективно в
лечении боли, нейропатической боли и/или зуда.

042675 B1

042675 B1

042675 B1

Область техники

Изобретение относится к 2-(3-(3-(2,4-диметоксиимидазин-5-ил)фенил)-3Н-имидазо[4,5-*b*]пиридин-6-ил)пропан-2-олу, который полезен в качестве модулятора рецептора ГАМК (гамма-аминомасляная кислота). В одном варианте осуществления указанное соединение эффективно в лечении боли, нейропатической боли и/или зуда.

Предшествующий уровень техники

ГАМК является основным тормозным нейромедиатором в ЦНС, включая пластину-II дорсального рога спинного мозга, где заканчиваются ноцицептивные волокна. Тормозящая нейротрансмиссия в спинном мозге имеет большое значение в передаче боли, и усиление торможения приводит к обезболиванию (Zeilhofer HU. et al. (2009), Trends in pharmacological science).

Было обнаружено, что модуляторы рецепторов ГАМК-А опосредуют глубокое обезболивание на животных моделях нейропатической боли (Munro, G. et al. (2013) European Journal of Pharmacology, 716, 1-3, 17-23). Современные методы лечения нейропатической боли имеют ограниченную эффективность для многих пациентов и связаны с нежелательными побочными эффектами или дозозамещающими токсическими эффектами. Кроме того, современные методы лечения являются симптоматическими, а не модифицирующими течение заболевания. По-прежнему существует потребность в улучшенных методах лечения нейропатической боли, особенно в тех, которые способны модифицировать течение заболевания.

Кроме того, ранее было продемонстрировано, что лиганды рецептора ГАМК-А могут быть эффективны в лечении зуда (см., например, WO 2017/129801).

Рецепторы ГАМК-А представляют собой лигандзависимые каналы, которые существуют в нескольких изоформах. Каждый рецептор представляет собой пентамерный комплекс, содержащий субъединицы, взятые из изоформ субъединиц α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ и θ . Большинство рецепторов ГАМК-А, присутствующих в ЦНС, содержат две α , две β и одну субъединицу γ (McKernan RM. et al. (1996). Trends in Neuroscience 19, 139-43). Фармакологические эффекты активации рецептора ГАМК-А зависят в основном от того, какой тип субъединиц содержит рецептор. Классические анксиолитические бензодиазепины не проявляют селективности по подтипу. Было высказано предположение, что один из ключевых элементов недостатков классических бензодиазепинов (таких как седативный эффект, зависимость и когнитивные нарушения) связан с субъединицей α_1 рецептора ГАМК-А. Недавние исследования на мышах с точечными мутациями, делающими различные субъединицы α нечувствительными к диазепаму, дают основания полагать, что субъединицы α_2 и α_3 опосредуют анальгетический эффект бензодиазепинов (Knabl J. et al. (2009). Pain 141, 233-38). Это подтверждается фармакологическими исследованиями, демонстрирующими анальгетический эффект селективных позитивных модуляторов рецепторов ГАМК-А, содержащих $\alpha_{2/3}$, на доклинических моделях боли (Munro G. et al. (2008). JPET, 327, 969-81). Таким образом, ожидается, что соединения с селективностью в отношении субъединиц α_2 и/или α_3 по сравнению с субъединицей α_1 будут иметь улучшенный профиль побочных эффектов.

Кроме того, было показано, что отсутствие опосредованного интернейронами ГАМК-ергического ингибирования в спинном мозге является причиной хронического зуда у мутантных мышей *Bhlhb5* (Ross SE. et al. (2010). Neuron 65, 886-98), что указывает на потенциальную терапевтическую активность за счет усиления спинального торможения.

WO 98/34923, EP 0616807, WO 2004/087690, WO 2007/110374 и WO 2010/055132 описывают производные бензимидазола, эффективные в лечении заболеваний и расстройств центральной нервной системы, которые чувствительны к модуляции рецепторного комплекса ГАМК-А.

WO 03/086406, WO 03/087099, WO 03/099816 и WO 01/18000 раскрывают производные имидазопиридина, используемые в качестве лигандов для рецепторов ГАМК.

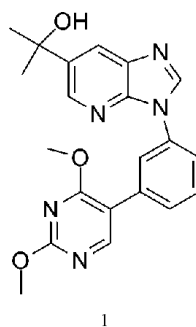
WO 2000/044752 и WO 99/67245 раскрывают производные триазолопиридина, подходящие в качестве лигандов для рецепторов ГАМК.

Эти ранее представленные модуляторы рецепторов ГАМК указывают на то, что незначительные структурные различия могут оказывать большое влияние на биологическую активность.

Однако многие из ранее представленных модуляторов рецепторов ГАМК связаны с нежелательными побочными эффектами. Таким образом, существует острая потребность в соединениях с оптимизированным фармакологическим профилем и без нежелательных побочных эффектов.

Краткое описание изобретения

В основном аспекте настоящее изобретение относится к 2-(3-(3-(2,4-диметоксиимидазин-5-ил)фенил)-3Н-имидазо[4,5-*b*]пиридин-6-ил)пропан-2-олу, представленному формулой 1 (соединение 1).



Кроме того, настоящее изобретение относится к применению соединения 1 в качестве лекарственного средства. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что соединение 1 представляет собой новый положительный аллостерический модулятор, избирательно действующий на рецептор ГАМК-А α_3 . Таким образом, в одном аспекте соединение 1 применяется в лечении, предотвращения и/или облегчения нейропатической боли. В другом аспекте соединение 1 применяется в лечении, предотвращения и/или облегчения зуда.

Описание фигуры

Фиг. 1. (А) Соединение 1, (В) соединение 9. Профиль эффективности на рецепторы ГАМК-А в двухэлектродных фиксациях потенциала на ооцитах. Для каждого набора экспериментальных данных ГАМК растворяли в содержащем ооциты растворе рингера в концентрации (0,5-3 мкМ), вызывающей токи, вызываемые ЕС₁₀₋₂₀ для данной комбинации подтипа рецепторов ГАМК-А. Пиковые токи считывали и нормировали к максимальной эффективной концентрации диазепама, после чего точки данных были подогнаны к эмпирическому уравнению Хилла с помощью нелинейной регрессии, n составляет от 3 до 14. Соединение 1 демонстрирует избирательное усиление ГАМК-опосредованных токов в рецепторах, содержащих ГАМК-А α_3 , незначительную активацию (менее 10%) субъединиц ГАМК-А $\alpha_{2/5}$ и отсутствие активации рецепторов, содержащих ГАМК-А α_1 .

Фиг. 2. Влияние соединения 1 после однократного введения на поведение расчесывания у самцов мышей CD-1. Кратковременное лечение соединением 1 способствовало регрессии механической аллодинии у крыс с поражением ССИ (хроническая компрессия) с минимальной эффективной дозой, меньшей или равной 1 мг/кг, после перорального введения. После 7 дней длительного лечения сохранялся значительный анальгетический эффект всех трех доз, в то время как действие морфина (6 мг/кг) полностью пропало. Морфин вводили подкожно. Хроническую компрессию (CCI) у самцов крыс Sprague Dawley (Спрег-Дули, SD) выполняли, как описано Bennette and Xie's (1998). Животные были протестированы через 14 дней после операции. $**p<0,01$, $****p<0,0001$ по сравнению с носителем, двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным тестом LSD (метод наименьшей значимой разности) Фишера, n составляет от 7 до 9.

Фиг. 3. Влияние соединения 1 после однократного и многократного введения на порог отдергивания лапы у крыс с поражением ССИ. Соединение 1 дозозависимым образом снижало вызванное соединением 48/80 поведение расчесывания у самцов мышей CD-1. Соединение 48/80, введенное в объеме 50 мкл подкожно в загривок, вызывало заметное и значимое увеличение приступов расчесывания по сравнению с мышами, которым вводили носитель. Гистаминергический антагонист H1, дифенгидрамина гидрохлорид, использовали в качестве препарата сравнения и вводили перорально за 60 мин до соединения 48/80, тогда как соединение 1 вводили перорально за 30 мин до введения соединения 48/80. $####p<0,0001$ по сравнению с физиологическим раствором; $***p<0,001$, $**p<0,01$, по сравнению с носителем + соединение 48/80, однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом LSD Фишера, n составляет от 7 до 9.

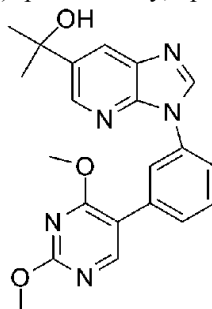
Фиг. 4. Влияние соединения 1 на исследовательскую локомоторную активность у самцов крыс SD. Соединение 1 в дозе до 30 мг/кг, что соответствует свободной концентрации в мозге 494, не влияло на исследовательскую локомоторную активность у самцов крыс Спрег-Дули ($p>0,05$ двухфакторный дисперсионный анализ повторных измерений со временем и дозой в качестве факторов). Соединение 1 вводили перорально в дозах 3, 10 и 30 мг/кг, 10 мл/кг за 120 мин до помещения крыс в новые домашние клетки в условиях тусклого света. Активность крыс автоматически регистрировали в течение 30 мин (TSE MoTil, Германия).

Фиг. 5. Влияние соединения 1 на показатели в тесте вращающегося стержня у самцов крыс SD. Соединение 1 в дозе до 30 мг/кг не ухудшало способность крыс поддерживать равновесие на ускоряющемся вращающемся стержне, измеренное как время ожидания до падения со стержня. Напротив, неселективный позитивный модулятор рецептора ГАМК-А, диазепам, значительно сократил латентный период до падения ($p<0,05$). Соединение 1 и диазепам вводили перорально за 2 и 1 ч до начала теста соответственно. Крыс тренировали на вращающемся стержне в течение двух дней при 4-40 об/мин в течение 5 мин перед тем, как оценивать эффекты лекарственного средства на 3-й день. Крысы, которые не могли бежать более 90 с после обучения, не включались в эксперимент. $*p<0,05$, по сравнению с носителем, од-

нофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом LSD Фишера, n составляет от 6 до 7.

Подробное описание изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение относится к 2-(3-(3-(2,4-диметоксиимидазин-5-ил)фенил)-3Н-имидазо[4,5-*b*]пиридин-6-ил)пропан-2-олу, представленному формулой 1.



1

В одном из вариантов осуществления соединение 1 представляет собой фармацевтически приемлемую соль.

Соединение по изобретению может существовать в таутомерной форме.

Фармацевтически приемлемые соли.

Химическое соединение по изобретению может быть представлено в любой форме, подходящей для предполагаемого введения, включая фармацевтически (т.е. физиологически) приемлемые соли. Примеры фармацевтически приемлемых аддитивных солей включают, без ограничения, нетоксичные аддитивные соли неорганических и органических кислот, такие как гидрохлорид, гидробромид, нитрат, перхлорат, фосфат, сульфат, формиат, ацетат, аконат, аскорбат, бензолсульфонат, бензоат, циннамат, цитрат, эмбонат, энантат, фумарат, глутамат, гликолят, лактат, малеат, малонат, манделат, метансульфонат, нафталин-2-сульфонат, фталат, салицилат, сорбат, стеарат, сукцинат, тартрат, толуол-пара-сульфонат и подобные им. Такие соли могут быть получены способами, хорошо известными и описанными в данной области. Другие кислоты, такие как щавелевая кислота, которые нельзя считать фармацевтически приемлемыми, могут быть полезны при получении солей, используемых в качестве промежуточных продуктов при получении химического соединения по изобретению и его фармацевтически приемлемой кислотно-аддитивной соли.

Примеры фармацевтически приемлемых катионных солей соединения 1 по изобретению включают, без ограничения, соль натрия, калия, кальция, магния, цинка, алюминия, лития, холина, лизиния и аммония и аналогичные соединения 1 по изобретению, содержащие анионную группу. Такие катионные соли могут быть получены способами, хорошо известными и описанными в данной области. В контексте данного изобретения "ониевые соли" азотсодержащих соединений также рассматриваются как фармацевтически приемлемые соли. Предпочтительные "ониевые соли" включают алкил-ониевые соли, циклоалкил-ониевые соли и циклоалкилалкил-ониевые соли.

Меченые соединения.

Химическое соединение по настоящему изобретению можно использовать в его меченой или немеченой форме. В контексте данного изобретения меченое соединение имеет один или более атомов, замещенных атомом, имеющим атомную массу или массовое число, отличное от атомной массы или массового числа, обычно встречающихся в природе. Маркировка позволит легко количественно определить указанное соединение.

Меченые соединения по изобретению могут быть полезны в качестве диагностических инструментов, радиоиндикаторов или агентов для мониторинга в различных диагностических методах и для визуализации рецепторов *in vivo*. Меченый изомер по изобретению предпочтительно содержит по меньшей мере один радионуклид в качестве метки. Все радионуклиды, излучающие позитроны, являются кандидатами для применения. В контексте данного изобретения радионуклид предпочтительно выбирают из ^2H (дейтерия), ^3H (трития), ^{13}C , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I и ^{18}F .

Физический способ обнаружения меченого изомера по настоящему изобретению может быть выбран из позиционно-эмиссионной томографии (PET), однофотонной компьютерной томографии (SPECT), магнитно-резонансной спектроскопии (MRS), магнитно-резонансной томографии (MRI) и компьютерной аксиальной рентгеновской томографии (CAT) или их комбинации.

Способы получения.

Химические соединения по изобретению могут быть получены обычными методами химического синтеза, например, описанными в рабочих примерах. Исходные материалы для способов, описанных в настоящей заявке, известны или могут быть легко получены обычными способами из коммерчески доступных химических веществ.

Конечные продукты описанных в настоящей заявке реакций могут быть выделены обычными методами, например экстракцией, кристаллизацией, дистилляцией, хроматографией и т.д.

Соединения по настоящему изобретению могут существовать в несольватированных, а также в сольватированных формах с фармацевтически приемлемыми растворителями, такими как вода, этанол и т.п. Обычно сольватированные формы считаются эквивалентными несольватированным формам для целей настоящего изобретения.

Фармацевтические композиции.

Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим терапевтически эффективное количество соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли вместе по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым носителем, эксципиентом или разбавителем.

Хотя соединение 1 по настоящему изобретению для применения в терапии можно вводить в форме исходного химического соединения, предпочтительным является введение активного ингредиента, необязательно в форме физиологически приемлемой соли, в состав фармацевтической композиции вместе с одним или более адъювантами, эксципиентами, носителями, буферами, разбавителями и/или другими обычными фармацевтическими вспомогательными веществами.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим химическое соединение по изобретению или его фармацевтически приемлемую соль вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями и необязательно другими терапевтическими и/или профилактическими ингредиентами, известными и используемыми в данной области техники. Носитель(-и) должен быть "приемлемым" в том смысле, что он должен быть совместим с другими ингредиентами препарата и не вреден для его реципиента.

Фармацевтические композиции по изобретению могут быть подходящими для перорального, ректального, бронхиального, назального, легочного, местного (включая буккальное и сублингвальное), трансдермального, вагинального или парентерального (включая кожную, подкожную, внутримышечную, внутрибрюшинную, внутривенную, внутриартериальную, внутримозговую, внутриглазную инъекции или инфузии) введений или в форме, подходящей для введения путем ингаляции или инсуффляции, включая порошки и жидкое аэрозольное введение, или с помощью систем замедленного высвобождения. Подходящие примеры систем замедленного высвобождения включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащих соединение по изобретению, причем матрицы могут быть в форме формованных изделий, например, пленок или микрокапсул.

Таким образом, соединение 1 по изобретению вместе с общепринятым адъювантом, носителем или разбавителем может быть составлено в форме фармацевтических композиций и их единичных доз. Такие формы включают твердые вещества и, в частности, таблетки, наполненные капсулы, формы порошка и гранул, а также жидкости, в частности водные или неводные растворы, суспензии, эмульсии, эликсиры и капсулы, заполненные ими, все для перорального применения, суппозитории для ректального введения и стерильные растворы для инъекций для парентерального применения. Такие фармацевтические композиции и их стандартные лекарственные формы могут содержать обычные ингредиенты в обычных порциях, с дополнительными активными соединениями или принципами или без них, и такие стандартные лекарственные формы могут содержать любое подходящее эффективное количество активного ингредиента, соизмеримое с предполагаемым диапазоном суточных доз, который будет использоваться. Соединение 1 по настоящему изобретению можно вводить в большом количестве пероральных и парентеральных лекарственных форм. Специалистам в данной области будет очевидно, что следующие лекарственные формы могут содержать в качестве активного компонента или химическое соединение по изобретению, или фармацевтически приемлемую соль химического соединения по изобретению.

Для получения фармацевтических композиций из соединения 1 по настоящему изобретению фармацевтически приемлемые носители могут быть твердыми или жидкими. Препараты в твердой форме включают порошки, таблетки, пилюли, капсулы, облатки, суппозитории и диспергируемые гранулы. Твердый носитель может представлять собой одно или более веществ, которые также могут действовать как разбавители, вкусовые ароматизирующие вещества, солиubilизаторы, смазывающие вещества, суспендирующие агенты, связующие вещества, консерванты, дезинтегрирующие агенты для таблеток или инкапсулирующий материал.

Фармацевтические препараты предпочтительно находятся в стандартных лекарственных формах. В такой форме препарат разделен на стандартные дозы, содержащие соответствующие количества активного компонента. Стандартная лекарственная форма может представлять собой упакованный препарат, причем упаковка содержит дискретные количества препарата, такие как упакованные таблетки, капсулы и порошки во флаконах или ампулах. Также, стандартная лекарственная форма может представлять собой капсулу, таблетку, облатку или лепешку, или это может быть подходящее количество любой из них в упакованной форме.

Терапевтически эффективная доза относится к тому количеству активного ингредиента, которое облегчает симптомы или состояние. Терапевтическая эффективность и токсичность, например ED₅₀, могут быть определены стандартными фармакологическими процедурами на культурах клеток или экспериментальных животных. Соотношение доз между терапевтическими и токсическими эффектами является терапевтическим индексом и может быть выражено соотношением между уровнями в плазме, приводящими к терапевтическим эффектам, и соотношениями в плазме, приводящими к токсическим эффектам.

там. Фармацевтические композиции, демонстрирующие высокие терапевтические индексы, являются предпочтительными.

Вводимая доза, конечно, должна быть тщательно скорректирована с учетом возраста, веса и состояния пациента, которого лечат, а также пути введения, лекарственной формы и режима, и также желаемого результата, и точная дозировка, конечно же, должна определяться практикующим врачом.

Фактическая дозировка зависит от природы и тяжести заболевания, которое лечат, и находится в пределах усмотрения врача, и может быть изменена путем постепенного подбора дозировки в соответствии с конкретными условиями настоящего изобретения для получения желаемого терапевтического эффекта. Однако в настоящее время предполагается, что фармацевтические композиции, содержащие от примерно 0,1 до примерно 10000 мг активного ингредиента на одну дозу, предпочтительно от примерно 1 до примерно 1000 мг, наиболее предпочтительно от примерно 10 до примерно 500 мг, подходят для терапевтического лечения. Активный ингредиент можно вводить одной или несколькими дозами в день. В некоторых случаях удовлетворительный результат может быть получен при такой низкой дозировке, как 0,1 мг/кг внутривенно и 1 мг/кг перорально. В настоящее время считается, что верхний предел диапазона дозировки составляет примерно 10 мг/кг внутривенно и 100 мг/кг перорально. Предпочтительные диапазоны составляют от примерно 0,1 мг/кг до примерно 10 мг/кг/сут внутривенно и от примерно 1 мг/кг до примерно 100 мг/кг/сут перорально.

Биологическая активность.

Соединение 1 по настоящему изобретению способно модулировать рецепторный комплекс ГАМК-А и, как было продемонстрировано, является положительным аллостерическим модулятором (РАМ) рецепторов ГАМК-А, содержащим субъединицу α_3 и, в меньшей степени, субъединицы α_2 и α_5 . Соединение 1 способствует регрессии механической аллодинии в модели нейропатической боли на крысах после кратковременного и длительного лечения, а также уменьшает расчесывания у мышей, которым вводили вызывающее зуд соединение, что указывает на анальгетический, а также противозудный эффект. Соединение 1 не проявляет предрасположенности к седативным и связанным с двигательными нарушениями эффектам согласно измерениям исследовательской локомоторной активности крыс и показателям в тесте вращающегося стержня.

Способы терапии.

Являясь лигандом рецепторов ГАМК-А, соединение 1 может применяться в лечении, предотвращении и/или облегчения заболеваний живого организма, включая человека. Предпочтительно соединение 1 применяется в лечении, предотвращении и/или облегчения боли, такой как нейропатическая боль, и/или зуда.

Лечение нейропатической боли.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению 2-(3-(3-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)фенил)-3Н-имидазо[4,5-*b*]пиридин-6-ил)пропана-2-ола, представленного формулой 1, в лечении, предотвращении и/или облегчения нейропатической боли.

Нейропатическая боль - это категория боли, которая включает несколько форм хронической боли и возникает в результате дисфункции нервной, а не соматической ткани. Нейропатическая боль, то есть боль, возникающая из-за дисфункции центральной или периферической нервной системы, также может быть следствием повреждения периферических нервов или областей центральной нервной системы, может быть результатом заболевания или может быть идиопатической. Симптомы нейропатической боли включают ощущение жжения, покалывания, электричества, иголок, парестезии, дизестезии, скованности, онемения конечностей, ощущения телесного искажения, аллодинии (боли, вызванной стимуляцией, которая обычно безвредна), гипералгезии (аномальной чувствительности к боли), гиперпатии (усиленной болевой реакции, сохраняющейся долгое время после прекращения болевых раздражителей), фантомной боли и спонтанной боли.

Лечение зуда.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению 2-(3-(3-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)фенил)-3Н-имидазо[4,5-*b*]пиридин-6-ил)пропана-2-ола, представленного формулой 1, в лечении, предотвращении и/или облегчении зуда.

Зуд (также известный как прурит) - это ощущение, которое вызывает желание или рефлекс почесаться. Было показано, что зуд во многом похож на боль. В большинстве случаев зуд связан с гистамином и лечится антигистаминными препаратами. Однако в некоторых случаях зуд нельзя лечить антигистаминными препаратами. Возможные причины зуда включают сухость кожи, кожные заболевания и сыпь, заболевания внутренних органов, нервные расстройства, раздражение и аллергические реакции, лекарственные препараты и беременность.

Многие поражения кожи, такие как кожные заболевания, перхоть, точечная ладонно-подошвенная кератодермия, чесотка, рост рубцов, ксероз, вши, ветряная оспа и крапивница, вызывают зуд. Указанные кожные заболевания включают псориаз, экзему (дерматит), солнечный ожог, "стопы атлета" и гнойный гидраденит.

Кожный зуд может быть признаком какого-либо заболевания. К ним относятся заболевания печени, почечная недостаточность, сахарный диабет, гиперпаратиреоз, железодефицитная анемия, желтуха, хо-

лестаз, уремия, полицитемия, проблемы с щитовидной железой и рак, включая лейкемию и лимфому. Заболевания, влияющие на нервную систему, такие как рассеянный склероз, сахарный диабет, защемление нервов и опоясывающий лишай (герпес зостер), могут вызывать зуд.

Зуд может быть спровоцирован или усилен рядом материалов и химических веществ, таких как шерсть, косметика, мыло, гистамин, опиоиды, простагландины, протеазы, цитокины, нейропептиды, в частности, вещество P, серотонин, соединение хлорохина 48/80 (CAS NO. 94724-12-6) и желчные соли. Пищевые аллергии также могут вызывать кожный зуд.

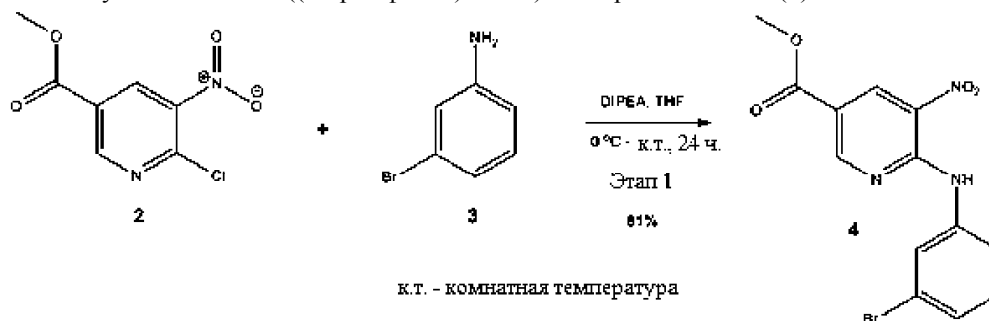
Факторы, которые, как полагают, усиливают ощущение зуда, включают сухость эпидермиса и дермы, кислородное голодание тканей, расширение капилляров, раздражающие воздействия, первичные кожные заболевания и психические расстройства.

В одном варианте осуществления зуд представляет собой пруриг. В одном варианте осуществления пруриг представляет собой анальный зуд (Pruritus ani). В одном варианте осуществления пруриг представляет собой зуд мошонки (Pruritus scroti). В одном варианте осуществления пруриг представляет собой зуд вульвы (Pruritus vulvae). В одном варианте осуществления пруриг представляет собой аногенитальный зуд (Anogenital pruritus).

Примеры

Пример 1: Получение 2-(3-(3-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)фенил)-3Н-имидазо[4,5-б]пиридин-6-ил)пропан-2-ола (1).

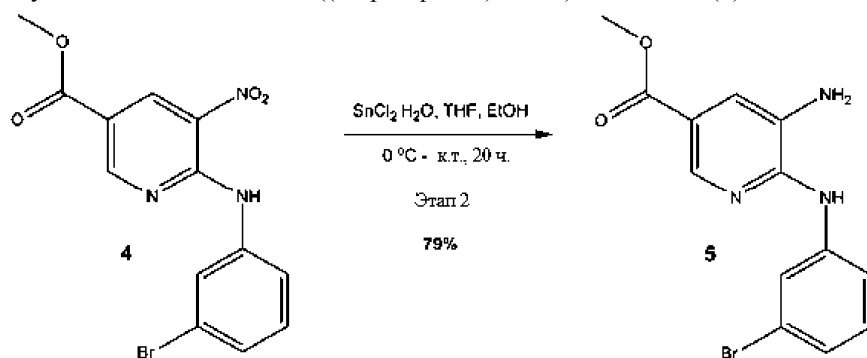
Этап 1: Получение метил-6-((3-бромфенил)амино)-5-нитроникотината (4).



К перемешиваемому раствору 6-хлор-5-нитро-никотиновой кислоты 2 (100 г, 461,72 ммоль) в безводном тетрагидрофуране (750 мл) при 0°C добавляли N,N-диизопропилэтиламин (120,6 мл, 692,58 ммоль) с последующим добавлением 3-броманилина 3 (55 мл, 494,1 ммоль) по каплям. Реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 24 ч в атмосфере азота. Прохождение реакции отслеживали путем TLC (тонкослойная хроматография) и UPLC (сверхэффективная жидкостная хроматография). Реакционную смесь концентрировали до половины ее первоначального объема при пониженном давлении. К реакционной смеси добавляли петролейный эфир (800 мл) и суспензию перемешивали в течение 1 ч. Появившееся оранжевое твердое вещество фильтровали под вакуумом и тщательно промывали петролейным эфиром (8×300 мл) с получением метил-6-((3-бромфенил)амино)-5-нитроникотината 4 (132 г, 81%) в виде оранжевого твердого вещества.

¹H ЯМР (ядерный магнитный резонанс) (400 МГц, DMSO-d₆ (DMSO - диметилсульфоксид): δ=10,31 (s, 1H, обменный протон), 8,94 (s, 1H), 8,82 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,63 (d, J=7,60 Гц, 1H), 7,41-7,36 (m, 2H), 3,88 (s, 3H); LCMS (жидкостная хроматомакс-спектрометрия) (ESI (ионизация электроспреем)): m/z: 352,9 (M+H)⁺.

Этап 2: Получение метил-5-амино-6-((3-бромфенил)амино)никотината (5).

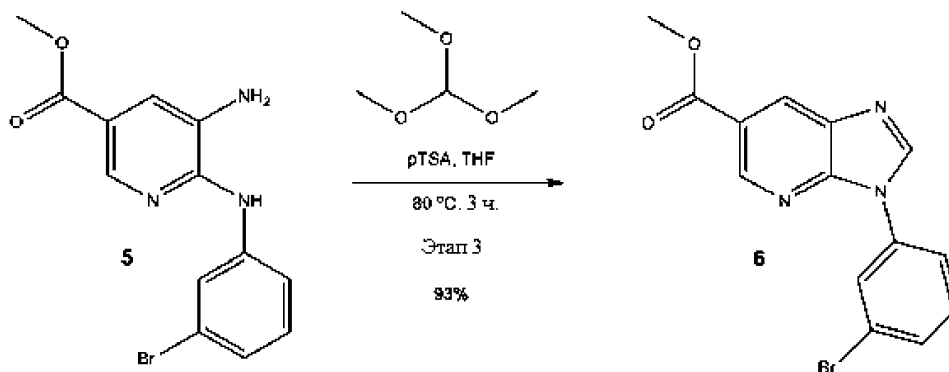


К охлажденной (0°C) суспензии метил-6-((3-бромфенил)амино)-5-нитроникотината 4 (485 г; 1377,28 ммоль) в смеси этанол: THF (тетрагидрофуран) [1:1; (2600 мл)], добавляли дигидрат хлорида олова (932,3 г; 4131,8 ммоль) порциями при 0°C и реакционную смесь перемешивали в течение 20 ч в атмосфере азота, позволяя температуре реакционной смеси достичь температуры окружающей среды. За

ходом реакции следили с помощью TLC и UPLC. Через 20 ч реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и полученный остаток разбавляли водой (1000 мл). Водную смесь подщелачивали твердым бикарбонатом натрия (до pH приблизительно 9-10) при 5°C. Затем к водной части добавляли хлороформ (1500 мл) и перемешивали в течение 15 мин, появлялись нерастворимые неорганические соединения и фильтровали через слой целита. Слой тщательно промывали хлороформом (5×500 мл). Органический слой отделяли, промывали насыщенным солевым раствором (800 мл), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали, получая метил 5-амино-6-((3-бромфенил)амино)никотинат 5 (350 г, 78,88%) в виде сероватого твердого вещества.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ=8,38 (с, 1H, обменный протон), 8,13 (с, 1H), 8,06 (с, 1H), 7,70 (d, J=10,00 Гц, 1H), 7,42 (с, 1H), 7,27-7,22 (m, 1H), 7,13-7,10 (m, 1H), 5,31 (с, 2H, обменный протон), 3,80 (с, 3H); LCMS (ESI): m/z: 324,0 (M+H)⁺.

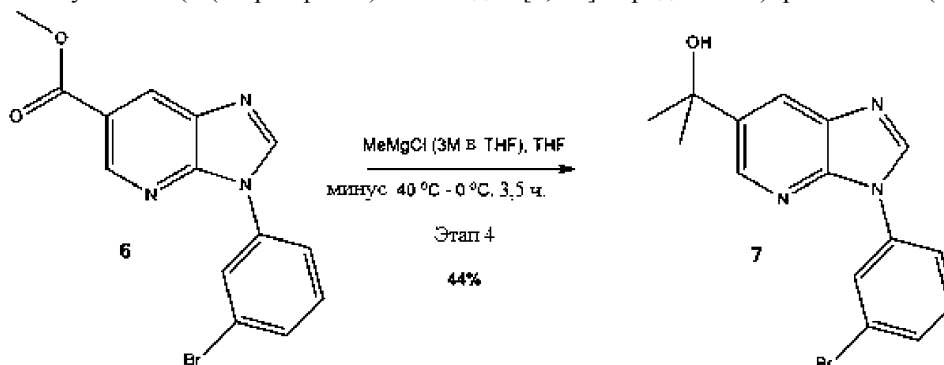
Этап 3: Получение метил-3-(3-бромфенил)-3H-имидазо[4,5-b]пиридин-6-карбоксилата (6).



К перемешиваемому раствору метил 5-амино-6-((3-бромфенил)амино)никотината 5 (350 г, 1086,41 ммоль) в безводном THF (3000 мл) добавляли триметилортоформиат (172,94 г, 1629,6 ммоль) с последующим добавлением - п-толуолсульфоновая кислота (pTSA) (61,99 г, 325,92 ммоль) одной порцией, и реакционную массу нагревали до 80°C в атмосфере азота. За ходом реакции следили с помощью TLC и UPLC. Через 3 ч реакционной смеси давали нагреться до температуры окружающей среды и растворитель удаляли при пониженном давлении. Полученный неочищенный продукт разбавляли водой (1000 мл) и водную часть подщелачивали бикарбонатом натрия до pH приблизительно 9-10 при перемешивании при комнатной температуре. Перемешивание продолжали еще 1 ч. Появившееся твердое вещество фильтровали под вакуумом и полностью сушили в вакууме с получением сырой массы (380 г, 105,3% массовый баланс) в виде твердого вещества грязно-белого цвета. Сырой продукт растворяли в хлороформе (5000 мл), промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением метил-3-(3-бромфенил)-3H-имидазо[4,5-b]пиридин-6-карбоксилата 6 (335 г, 92,83%) в виде твердого вещества почти белого цвета.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ=9,12 (с, 1H), 9,03 (d, J=2,00 Гц, 1H), 8,67 (d, J=2 Гц, 1H), 8,27-8,26 (m, 1H), 8,04-8,01 (m, 1H), 7,73-7,71 (m, 1H), 7,63-7,59 (m, 1H), 3,94 (с, 3H); LCMS (ESI): m/z: 334,0 (M+H)⁺.

Этап 4: Получение 2-(3-(3-бромфенил)-3H-имидазо[4,5-b] пиридин-6-ил)пропан-2-ола (7).

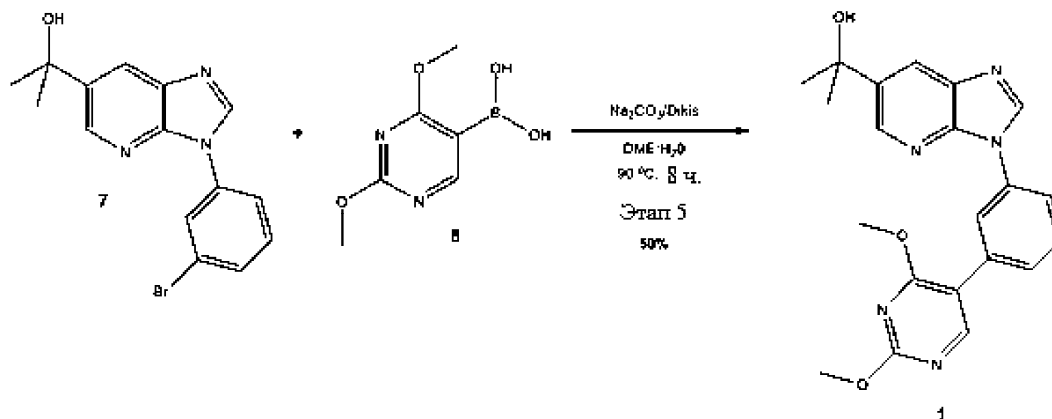


К перемешиваемой суспензии метил 3-(3-бромфенил)-3H-имидазо[4,5-b]пиридин-6-карбоксилата 6 (50 г, 150,53 ммоль) в безводном THF (600 мл) при минус 20°C добавляли раствор MeMgCl [(72 мл, 143,92 ммоль); 2М в THF] по каплям в течение 30 мин в атмосфере азота. Реакционную смесь перемешивали в течение 3,5 ч в атмосфере азота, поддерживая температуру реакции от минус 20°C до 0°C. За ходом реакции следили с помощью TLC и UPLC. Через 3,5 ч реакционную массу гасили насыщенным раствором хлорида аммония (1500 мл), водный слой экстрагировали этилацетатом (3×1000 мл), объединенный органический слой промывали насыщенным солевым раствором (500 мл), сушили над безводным

сульфат натрия, фильтровали и концентрировали с получением сырой массы (51 г, массовый баланс 102%) в виде коричневой смолы. Сырой продукт очищали флэш-колоной над слоем нейтрального оксида алюминия, используя 20% этилацетат в гексане в качестве элюента, с получением желаемого продукта 2-(3-(3-бромфенил)-3Н-имидазо[4,5-б]пиридин-6-ил)пропан-2-ола 7 (22 г, 44%) в виде коричневой камеди.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6): δ =8,95 (s, 1H), 8,62 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 8,06 (d, J =8,00 Гц, 1H), 7,65 (d, J =8,00 Гц, 1H), 7,59-7,55 (m, 1H), 5,32 (s, 1H, обменный протон), 1,55 (s, 6H); LCMS (ESI): m/z : 334,0 (M + H).

Этап 5: Получение 2-(3-(3-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)фенил)-3Н-имидазо[4,5-б]пиридин-6-ил)пропан-2-ола (1).



К перемешиваемому раствору 2-(3-(3-бромфенил)-3Н-имидазо[4,5-б]пиридин-6-ил)пропан-2-ола 7 (0,75 г, 2,25 ммоль) в смеси 1,2-диметоксизан: вода [2:1; (45 мл)], добавляли 2,4-диметоксипиримидин-5-бороновую кислоту 8 (0,456 г, 2,48 ммоль), а затем Na_2CO_3 (0,478 г, 4,51 ммоль). Смесь дегазировали газообразным азотом в течение 25 мин. К указанной выше реакционной смеси добавляли бис(трифенилфосфин)палладий (II) дихлорид (0,079 г, 0,112 ммоль) и нагревали до 90°C в атмосфере азота. За ходом реакции следили с помощью TLC и UPLC. Через 15 ч реакционной смеси давали нагреться до температуры окружающей среды и гасили холодной водой (75 мл). Водную часть экстрагировали этилацетатом (3×200 мл), и объединенный органический слой промывали рассолом (2×50 мл), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали с получением сырого продукта (0,865 г; массовый баланс 97,8%) в виде коричневой смолы. Неочищенный продукт очищали флэш-колоной, используя 50% этилацетат в гексане в качестве элюента, с получением желаемого продукта (0,575 г) в виде грязно-белого твердого вещества, которое затем растирали, фильтровали и сушили под вакуумом с получением 2-(3-(3-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)фенил)-3Н-имидазо[4,5-б]пиридин-6-ил)пропан-2-ола (1) (0,5 г, 56,62%) в виде твердого вещества грязно-белого цвета.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6): δ =8,94 (s, 1H), 8,60 (d, J =2,00 Гц, 1H), 8,54 (s, 1H), 8,24 (d, J =2,00 Гц, 1H), 8,13-8,12 (m, 1H), 8,01-7,98 (m, 1H), 7,70-7,63 (m, 2H), 5,3 (s, 1H, обменный протон), 3,98 (d, J =4,00 Гц, 6H), 1,55 (s, 6H); LCMS (ESI): m/z : 392,3 (M+H) $^+$, MR: 86,0-93,4°C.

Пример 2: Ингибирование связывания ^3H -флумазенила *in vitro*. Получение ткани.

Клеточные линии НЕК-293 со стабильной экспрессией рекомбинантных рецепторов ГАМК $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ культивировали (37°C, 5% CO_2) в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM) с ультраглутамином 1, 4500 мг/л D-глюкозы, 10% фетальной бычьей сывороткой и содержащей следующие антибиотики: зеоцин (0,1 мг/мл), гиромоцин В (0,15 мг/мл) и G418 (0,5 мг/мл).

Когда культуры достигли конфлюэнтности в больших культуральных колбах (175 cm^2), DMEM удаляли, а клетки промывали один раз в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (DPBS; KCl: 0,2 г/л, KH_2PO_4 : 0,2 г/л, NaCl: 8 г/л, Na_2HPO_4 : 1,15 г/л). Клетки собирали после добавления к культуре 2 мл DPBS в течение приблизительно 5 мин с последующим осторожным соскабливанием клеток со дна культуральной колбы. После добавления еще 15 мл DPBS клеточную суспензию переносили в пробирки Falcon и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Осадок промывали один раз в 15 мл трис-НСl или трис-цитратного буфера (50 мМ, pH 7,1) с использованием гомогенизатора Ultra-Turrax и центрифугировали при 2°C в течение 10 мин при 27000×g. Промытый осадок ресуспендировали в 15 мл трис-НСl или трис-цитратного буфера (50 мМ, pH 7,1) и замораживали при -80°C до дня эксперимента по связыванию.

Анализ.

В день эксперимента препарат мембран размораживали при комнатной температуре и центрифугировали при 2°C в течение 10 мин при 27000 g. Осадок ресуспендировали с использованием гомогенизатора Ultra-Turrax в трис-цитратном буфере (50 мМ, pH 7,1) до 30-150 мкг белка на анализ, а затем использовали для анализов связывания. Аликвоты 0,5 мл клеточной суспензии добавляли к 25 мкл исследуемого раствора и 25 мкл ^3H -флумазенила (1 нМ, конечная концентрация), смешивали и инкубировали

в двух экземплярах в течение 40 мин при 2°C. Неспецифическое связывание определяли с использованием клоназепама (1 мкМ, конечная концентрация).

Все разведения тестируемых соединений и инкубацию для анализа проводили в стеклянных флаконах/планшетах. Растворы тестируемых соединений и 3Н-флунизтазема были приготовлены в 22 раза больше желаемой конечной концентрации. Соединения растворяли в 100% DMSO (10 мМ исходный раствор), разбавляли смесью 48% этанол-вода и тестировали в трех экземплярах в последовательных разведениях.

Связывание прекращали быстрой фильтрацией на стекловолоконных фильтрах Whatman GF/C с использованием харвестера клеток Brandel с последующими 10 промываниями 1 мл ледяного трис-цитратного буфера.

Количество радиоактивности на фильтрах определяли обычным жидкостным сцинтилляционным счетом с использованием счетчика Tri-Carb™ (PerkinElmer Life and Analytical Sciences). Специфическое связывание представляет собой полное связывание за вычетом неспецифического связывания.

Результаты.

Таблица 1
Значения K_i и IC_{50} для соединения 1.

Соединение	K_i (мкМ)	IC_{50} (мкМ)
2-(3-(3-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)фенил)-3Н-имидазо[4,5-b]пиридин-6-ил)пропан-2-ол (1)	0,015	0,038

Значение IC_{50} представляет собой концентрацию исследуемого вещества, которая ингибирует специфическое связывание 3H -флумазенила на 50%.

$$IC_{50} = (\text{применяемая концентрация } 1) * \frac{1}{\left(\frac{C_0}{C_x} - 1\right)},$$

где C_0 - специфическое связывание в контрольном анализе, а

C_x - специфическое связывание в тестовом анализе.

Выводы.

Было обнаружено, что 2-(3-(3-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)фенил)-3Н-имидазо[4,5-b]пиридин-6-ил)пропан-2-ол (1) имеет значение K_i 0,015 мкМ и значение IC_{50} 0,038 мкМ.

Пример 3: Электрофизиологические исследования на ооцитах.

Представленный здесь анализ проводится для определения функциональной активности *in vitro*, а также эффективности РАМ в отношении основных подтипов рецепторов ГАМК-А головного мозга. Чтобы установить это, полный профиль ответов на концентрацию определяли при концентрации ГАМК, дающей 5-20% максимального вызванного ГАМК ответа от рецепторов $\alpha_1\beta_2\gamma_2$, $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, $\alpha_3\beta_2\gamma_2$ и $\alpha_5\beta_2\gamma_2$, экспрессируемых в ооцитах *Xenopus laevis*.

Препарат ооцитов *Xenopus laevis*.

Дефолликулированные коллагеназой ооциты *X. laevis* были получены от Ecosyte Bioscience. Для инъекции ооциты помещали в специально разработанную камеру в модифицированном растворе Барта (90 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 0,66 мМ $NaHCO_3$, 2,4 мМ $NaHCO_3$, 0,74 мМ $CaCl_2$, 0,82 мМ $MgCl_2$, 100 мкг/мл гентамицина и 10 мМ HEPES, доведенный до pH 7,55) и вводили 25-50 нл смеси кРНК с помощью Pico Pump (WPI). Смесь кРНК содержит субъединицы α_x , β_2 и γ_{2s} ГАМК-АР в соотношении 3:1:3 и в общей концентрации 0,5 мкг/мкл. После инъекции ооциты поддерживали при 18°C в модифицированном растворе Барта в течение 1-5 дней.

Эксперименты с двухэлектродной фиксацией потенциала.

Электрофизиологические ответы ооцитов *X. laevis* измеряли с использованием метода фиксации потенциала с двумя электродами. Отдельные ооциты помещали в специально сконструированные запи-сывающие камеры, которые непрерывно перфузировали OR2 более 2 мл/мин (90 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 2,5 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$ и 5 мМ HEPES pH 7,4). Раствор для экспериментального анализа представлял собой стандартный буферный раствор OR2, измеренная осмолярность которого составляла приблизительно 180 мОсм. Регистрирующие электроды были изготовлены из трубок из боросиликатного стекла с нитью (Sutter BF150-110-10) с использованием съемника DMZ-Universal (Zeitz Instrument), заполнены 2 М KCl и при погружении в раствор OR2 сопротивление электродов находилось в диапазоне 0,5-1 МОм. Ооцит прокалывали с помощью ручных микроманипуляторов и позволяли уравновеситься при удерживающем потенциале от -50 мВ до -80 мВ в течение не менее 1 мин для обеспечения максимального тока утечки 100 нА перед началом эксперимента. Удерживающий потенциал обычно составлял -60 мВ, что значительно ниже, чем типичный потенциал покоя -25 мВ. В случае, если амплитуды тока были низкими в партии ооцитов, использовался удерживающий потенциал -80 мВ при условии, что ток утечки не пре-

вышал 100 нА. Токи усиливались усилителем Geneclamp 500В (Axon), фильтровались через фильтр нижних частот на 20 Гц, оцифровывались при 200 Гц с помощью Digidata 1322А (Axon), а затем записывались, а также анализировались на ПК (Compaq Evo) с использованием пакета pClamp9 (Axon).

Растворы соединений вводили через капиллярную трубку с внутренним диаметром 1,5 мм (Modulohm 214813), помещенную примерно в 2 мм от ооцита и соединенную через тефлоновую трубку с пробоотборником Gilson 233XL. Пакет программного обеспечения Gilson 735 использовался для управления всем оборудованием Gilson (автоматический пробоотборник 233XL, разбавитель 402 и насосы Minipuls 3) и для запуска записи с помощью pCLAMP9. Скорость потока 2,5 мл/мин через капиллярную трубку во время нанесений обеспечивала быстрый обмен жидкости, окружающей ооцит. Продолжительность приложения была установлена на 60 с, что было достаточно для получения пиковых токов. Интервал времени между записями составлял 5 мин, в течение которых ооцит также перфузировали OR2 через капиллярную трубку.

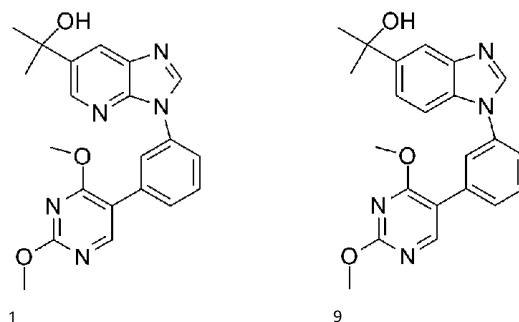
Опытные данные.

Для каждого набора экспериментальных данных ГАМК растворяли в OR2 в концентрации, которая, как известно, вызывала токи, вызываемые EC₅-EC₂₀ для данной комбинации подтипа рецепторов ГАМК-А (0,5-5 μ M), и этот раствор затем использовали для контроля, а также в качестве исходного раствора для растворения соединений для тестирования в эксперименте. Полный экспериментальный набор содержал четыре контрольных следа ГАМК, контрольный след диазепама 0,5 мкМ, 10 контрольных следов ГАМК и, наконец, следы тестируемого соединения в возрастающих концентрациях. Отдельные ооциты были выброшены после одной серии экспериментов.

Модулирующие эффекты диазепама были рассчитаны путем сравнения следа диазепама с контрольным следом непосредственно перед диазепамом. Аналогичным образом, модулирующие эффекты соединения в тестовых следах были получены путем сравнения с контролем непосредственно перед тестовыми следами. Чтобы сделать возможным сравнение эффектов соединения между отдельными ооцитами, все потенциации соединения были нормированы к контрольной потенциации диазепама на том же ооците.

Результаты.

Анализ был проведен для соединений 1 и 9, см. ниже, и результаты представлены на фиг. 1.



Выводы.

Как можно видеть из профилей ответов на концентрацию, модуляция соединениями 1 и 9 варьируется, особенно в отношении модуляции рецептора $\alpha_1\beta_2\gamma_2$. Важно отметить, что модуляция рецептора $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ близка к нулю для соединения 1, тогда как для соединения 9 она явно отрицательна. Этот пример также демонстрирует, что относительно небольшая структурная разница между двумя молекулами оказывает большое влияние на биологическую активность.

Пример 4: Кратковременные и долговременные эффекты соединения 1 на механическую аллодинию при хронической компрессии (CCI) у крыс.

Способ.

Животные:

Самцы крыс SPRD (Спрег-Дули) (Taconic), 140-160 грамм на момент операции

Операция:

Анестезию вызывали и поддерживали 2,5% изофлураном в сочетании с кислородом (30%) и записью азота (68%). Седалищный нерв обнажали на уровне середины бедра проксимальнее трифуркации седалищного нерва. Четыре хромированных кетгута (4/0) (Ethicon, New Brunswick, NJ) были свободно связаны вокруг нерва на расстоянии 1-2 мм друг от друга, так что кровоснабжение не было явно нарушено. Вышележащую мышцу послойно ушили синтетическим рассасывающимся хирургическим швом 4/0. Кожу закрывали 1-2 зажимами.

Тестирование поведения крыс с повреждением нервов.

Через 3-14 дней после операции за животными наблюдали на наличие механической аллодинии. Перед оценкой отдельных крыс удаляли из их домашней клетки и давали им возможность привыкнуть в течение 60 мин в открытой вентилируемой клетке из белого плексигласа размером 15×20 см, помещен-

ной на приподнятую металлическую решетку, обеспечивающую доступ к подошвенной поверхности травмированной задней лапы. Присутствие механической аллодинии оценивали с помощью серии калиброванных волосков фон Фрея (нижний предел=0,1 и верхний предел=26 г, Stoelting Co, Wood Dale IL), которые прикладывали к подошвенной поверхности лапы с возрастающей силой до тех пор, пока используемый отдельный волосок только начал гнуться. Волосок накладывали на 1-2 с и повторяли 5 раз с интервалами 1-2 с. Считается, что волосок, которая вызывает отдергивание лапы в 3 из 5 применений, представляет собой порог лапы (PWT) для возникновения механической аллодинической реакции. В эксперименты по тестированию лекарственного средства были включены только те животные, которые демонстрировали отчетливое поведение при нейропатической боли (аллодиния). Животные, показывающие PWT менее/или равному 4 г на ипсилатеральной лапе и PWT более/или равного 8 г на контрлатеральной лапе, считались аллодиническими. В дни тестирования лекарственного средства экспериментатор не знал о лечении.

Медикаментозное лечение проводилось на 15-е сутки после операции.

Медикаментозное лечение:

Кратковременный эффект препарата:

Соединение 1:1, 3, 10 мг/кг, 10 мл/кг на пероральный прием.

Предварительная обработка: 2 ч

Морфин-гидрохлорид: 6 мг/кг свободного основания, 1 мл/кг, подкожное введение.

Предварительная обработка: 30 мин

Носитель для соединения 1 и морфина: 5% DMSO+30% (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрин (HPBCD) в воде.

Статистическая оценка: однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом LSD Фишера для множественных сравнений.

Долговременный эффект препарата:

Соединение 1: 1, 3, 10 мг/кг, 10 мл/кг для перорального приема один раз в день в течение 7 дней. Гидрохлорид морфина: 6 мг/кг свободного основания, 1 мл/кг, подкожное введение один раз в день в течение 7 дней. На 8 день контролировали механическую аллодинию, применяя волоски фон Фрея ("базальный уровень"), где после того, как крысам вводили соединение 1 или гидрохлорид морфина, и механическую аллодинию контролировали с помощью волосков фон Фрея снова через 2 ч и 3 ч после введения дозы (соединение 1) или через 30 мин после приема (гидрохлорид морфина).

Носитель: 5% DMSO+30% HPBCD (в воде).

Статистическая оценка: однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом LSD Фишера для множественных сравнений.

Результаты.

Однократное введение соединения 1 приводило к значительному уменьшению нейропатического болевого поведения, что оценивалось путем мониторинга механической аллодинии с использованием нитей фон Фрея. Самая низкая испытанная доза, составляющая 1 мг/кг, а также доза 3 мг/кг значительно увеличивала порог отдергивания лапы по сравнению с введением носителя, контролируемая через 2 и 3 ч после обработки, см. фиг. 2 (2 ч: $p<0,01$, 3 ч: $p<0,05$, однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным LSD-тестированием Фишера). 10 мг/кг просто не достигли статистической значимости. Гидрохлорид морфина 6 мг/кг также значительно увеличивал порог отдергивания лапы по сравнению с введением носителя через 2 ч и 3 ч после обработки ($p<0,05$ и $p<0,001$ по сравнению с введением носителя соответственно). После 7 дней ежедневного введения соединения 1 значимое повышение порога отдергивания лапы сохранялось при 1-3 и 10 мг/кг, вводимых предварительно за 3 ч до тестирования ($p<0,05$, 0,01 и 0,01 по сравнению с носителем соответственно), и 10 мг/кг, вводимых за 2 ч до тестирования ($p<0,001$ по сравнению с носителем) (однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным LSD-тестированием Фишера). Напротив, долговременное лечение морфином до однократного введения лекарственного средства полностью устраняет аллодинический эффект, что указывает на развитие толерантности (фиг. 2).

Выводы.

Этот пример демонстрирует, что соединение 1 уменьшает нейропатическое болевое поведение после однократного введения лекарственного средства, и что данный эффект сохраняется после долговременного введения лекарственного средства, что указывает на отсутствие развития толерантности. Напротив, действие опиоида, гидрохлорида морфина, полностью теряется после долговременного введения лекарственного средства из-за развития толерантности.

Пример 5: Эффекты однократного введения соединения 1 на вызванные соединением 48/80 расчесывания у самцов мышей CD-1.

Способ.

Животные:

Самцы мышей CD-1 (22-30 г) (InterVivo Solutions, Канада)

Медикаментозное лечение:

Животных лечили одним из следующих способов: соединение 1, носитель (отрицательный кон-

троль) или гидрохлорид дифенгидрамина (положительный контроль); N составляет 8 мышей на группу. Соединение 1 вводили через желудочный зонд в концентрации 3, 10 и 30 мг/кг в носителе (5% DMSO+30% HPBCD в воде) за 30 мин до тестирования. Дифенгидрамина гидрохлорид вводили через желудочный зонд в дозе 60 мг/кг в 5% Твин 80 в дистиллированной воде (BEW=1,14) за 60 мин до тестирования. Все препараты вводили в дозе 10 мл/кг. Соединение 48/80 вводили внутривенно в шею в дозе 50 мкг/0,02 мл в физиологическом растворе.

Мониторинг поведения:

Визуальное наблюдение за приступами расчесывания в течение 30 мин. Визуальная оценка проводилась без учета лечения.

Статистическая оценка.

Однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом LSD Фишера для апостериорных сравнений.

Результаты.

Соединение 1 значительно уменьшало зуд, что оценивалось как приступы расчесывания, с минимальной эффективной дозой 10 мг/кг по сравнению с лечением носителем ($p < 0,01/0,001$ по сравнению с лечением носителем в дозах 10 и 30 мг/кг соответственно, однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом LSD Фишера для апостериорных сравнений), см. фиг. 3

Выводы.

Этот пример демонстрирует, что соединение 1 значительно облегчает поведение расчесывания у мышей, что указывает на положительное действие на зуд.

Пример 6. Мгновенные эффекты соединения 1 на исследовательскую локомоторную активность у самцов крыс Спрег-Дули (SD).

Способ.

Животные:

Самцы крыс SD (180-250 г, NTac: SD, Taconic, Дания)

Медикаментозное лечение:

Животных лечили одним из следующих способов: носитель (5% DMSO+30% HPBCD в воде) или соединение 1 (3, 10, 30 мг/кг, 10 мл/кг, пероральное введение) за 120 мин до тестирования n составляет 6-7 дозовую группу.

Мониторинг поведения:

Через 2 ч после введения дозы крыс помещали по отдельности в новые стандартные домашние клетки с уменьшенным количеством опилок. Клетки помещали в рамки, оборудованные фотоэлементами, использующими лучи света, позволяющими автоматически регистрировать локомоторное поведение (TSE Motil, Германия). Исследовательская локомоторная активность регистрировалась в течение 30 мин.

Статистическая оценка.

Однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом LSD Фишера для апостериорных сравнений.

Результаты.

Соединение 1 не оказывало никакого эффекта на исследовательскую локомоторную активность у самцов крыс SD в наивысшей испытанной дозе (30 мг/кг) (однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом LSD Фишера для апостериорных сравнений), см. фиг. 4.

Выводы.

Этот пример демонстрирует, что соединение 1 не влияло на исследовательскую локомоторную активность у крыс в исследованных дозах, что указывает на отсутствие склонности вызывать седативный эффект.

Пример 7. Мгновенный эффект соединения 1 на показатели в тесте вращающегося стержня у самцов крыс Спрег-Дули (SD).

Способ.

Животные:

Самцы крыс SD (180-250 г, NTac: SD, Taconic, Дания)

Медикаментозное лечение:

Животным вводили одну из следующих доз: носитель (5% DMSO+30% HPBCD в воде), соединение 1 (3, 10, 30 мг/кг, 10 мл/кг, пероральное введение) или диазепам 10 мг/кг (10 мл/кг, пероральное введение) за 120 или 60 мин до тестирования соответственно n составляет 6-7 дозовую группу.

Мониторинг поведения:

Крыс тренировали на ускоряющем вращающемся стержне (4-40 об/мин, PanLab), одно испытание продолжительностью 5 мин в день, в течение двух дней до тестирования лекарственного средства. В исследование были включены только крысы, которые могли оставаться на вращающемся стержне более 90 с после двух дней обучения. В день тестирования крыс помещали на вращающийся стержень, разгоняющийся со скоростью 4-40 об/мин/5 мин с минимально возможным временем пребывания на стержне, обозначенным как 0 с, и максимальным временем, проведенным на стержне, установленным на 300 с. Соединение 1 вводили за 2 ч до тестирования, тогда как положительный контроль, диазепам, вводили за

60 мин до тестирования.

Статистическая оценка.

Однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом LSD Фишера для апостериорных сравнений.

Результаты.

Соединение 1 не влияло на способность крыс балансировать на ускоряющем стержне, измеренную как латентность падения, в самой высокой испытанной дозе (30 мг/кг) по сравнению с крысами, обработанными носителем. Напротив, диазепам значительно сократил время падения со стержня ($p < 0,05$ по сравнению с обработкой носителем) (однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом LSD Фишера для апостериорных сравнений), см. фиг. 5.

Выводы.

Этот пример демонстрирует, что соединение 1 не ухудшало способность крыс поддерживать равновесие на ускоряющем стержне в испытанных дозах, что указывает на отсутствие склонности вызывать двигательные нарушения.

Пример 8: Связывание с белками плазмы, измеренное методом быстрого равновесного диализа.

Целью этого анализа является определение степени связывания тестируемого соединения с белками плазмы.

Способ.

Устройства быстрого равновесного диализа (RED):

Использовали одноразовые вставки, состоящие из двух расположенных бок о бок камер (плазменной и буферной), разделенных вертикальным цилиндром диализной мембраны (MWCO ок. 8000). Устройства RED помещали на тефлоновую базовую пластину и инкубировали в течение 4 ч при 37°C в инкубаторе Heidolph, установленном на 100 об/мин.

Анализ.

Анализ проводился в системе для обработки жидкости в соответствии со следующим описанием анализа:

Получение меченой плазмы.

Необходимое количество RED устройств помещали в тефлоновый базовый планшет и предварительно нагревали планшет в инкубаторе.

Добавляли 400 мкл плазмы в плазменную камеру и 600 мкл PBS-буфера (фосфатно-солевой буфер) в буферную камеру.

Инкубировали в течение 4 ч при 37°C в инкубаторе Heidolph, установленном на 140 об/мин.

После инкубации переносили 50 мкл из плазменных камер в пробирки Эппендорфа и добавляли 50 мкл PBS-буфера.

Соответственно, переносили 50 мкл из буферных камер в пробирки Эппендорфа и добавляли 50 мкл плазмы.

Все образцы осаждали 300 мкл MeCN.

Центрифуга в течение 25 мин при 5°C и 14000 об/мин (16000 g).

Перенести супернатант во флаконы для HPLC с водой MilliQ (вода, обработанная на фильтровальных аппаратах фирмы MilliQ) и равным объемом.

Анализ с помощью LC-MS/MS с обнаружением SRM (контроль селективных реакций).

Результаты.

Связывание с белками рассчитывали по следующей формуле:

$$\% \text{ Связывания белка} = \left(1 - \frac{A_{\text{буфер}}}{A_{\text{плазма}}} \right) * 100\%$$

Свободная фракция: $f_u = 100 - \% \text{ связывания с белками}$, где

Буфер представляет собой площадь, определенную с помощью LC-MS/MS для образца из буферной камеры.

Плазма представляет собой площадь, определенную методом LC-MS/MS для образца из плазменной камеры.

Свободная от плазмы фракция соединения 1 составляла 16% у мышей и 19% у крыс.

Выводы.

Соединение 1 в большом количестве в свободном виде присутствует в плазме для оказания фармакологических эффектов.

Пример 9: Связывание с тканью мозга.

Целью этого примера является оценка связывания белка соединения 1 с гомогенатом головного мозга крысы с использованием метода быстрого равновесного диализа (RED).

Материалы и оборудование.

Гомогенат головного мозга крысы.

Белковая фракция мозга крысы была получена из свежих тканей мозга, полученных от взрослых крыс Wistar. Самцов крыс линии Вистар (Харлан, Нидерланды) умерщвляли (согласно утвержденному

методу) и немедленно собирали ткань мозга. Белое вещество вырезали и готовили гомогенат ткани (10% мас./об.) в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4. Эту фракцию называли гомогенатом мозга и использовали в эксперименте.

Процедура равновесного диализа.

Подготовка тефлонового базового планшета.

Лунки Teflon® Base Plate промывали 20% этанолом в течение 10 мин. Этанол удаляли и лунки дважды промывали дистиллированной водой, после чего планшету давали высохнуть перед использованием.

Равновесный диализ.

1 мкл соединения 1 (2 мМ исходного раствора в 100% DMSO) добавляли в 200 мкл экстракта мозга (конечная концентрация 10 мкМ). 200 мкл образца помещали в камеру для образцов. В буферную камеру добавляли 350 мкл 10 мМ PBS. Блок накрыли герметизирующей лентой и инкубировали при 37°C на орбитальном шейкере при приблизительно 350 об/мин в течение 4 ч для достижения равновесия. Равные объемы как из буферной камеры, так и из экстрагирующей камеры затем удаляли и помещали в отдельные микроцентрифужные пробирки.

Процедура анализа проб.

50 мкл каждого образца после диализа переносили пипеткой из буферной и экстрагирующей камер в отдельные микроцентрифужные пробирки. К образцам буфера добавляли 50 мкл экстракта, а также равный объем PBS к собранным образцам экстракта. 300 мкл буфера для осаждения (ацетонитрил 90/10: вода, содержащая 0,1% муравьиной кислоты с внутренним стандартом, т.е. толбутамид или ибупрофен, 5 мкг/мл) добавляли для осаждения белка и высвобождения соединения, которые перемешивали и инкубировали 30 мин на льду перед 10-минутным центрифугированием при 13000-15000 g. Затем супернатант переносили во флаконы или 96-луночный планшет и проводили количественные измерения с помощью LC/MS/MS. Концентрацию соединения 1 в буферной и экстрагирующей камерах для определяли по площадям пиков относительно внутреннего стандарта.

Результаты.

Долю несвязанной фракции (f_u) рассчитывали по следующей формуле:

$$f_{u, \text{разведенная}} = \frac{A_{\text{буфер}}}{A_{\text{гомогенат мозга}}}$$

$$f_{u, \text{неразведенная}} = \frac{\frac{1}{D}}{\frac{1}{f_{u, \text{разведенная}}} + \frac{1}{D}} * 100\%$$

где $A_{\text{буфер}}$ представляет собой площадь, определенную с помощью LC-MS/MS для образца из буферной камеры;

$A_{\text{гомогенат мозга}}$ представляет собой площадь, определенную с помощью LC-MS/MS для образца из камеры гомогената мозга.

Стандартные соединения: галоперидол (высокое связывание) и кофеин (низкое связывание).

Свободная фракция соединения 1 в ткани мозга крыс составляла 7%.

Вывод.

Соединение 1 в большом количестве в свободном виде присутствует в головном мозге для оказания фармакологических эффектов.

Пример 10: Фармакокинетический профиль.

Целью этого примера является получение фармакокинетических данных. Образцы плазмы обычно брали в 6-8 временных точек (N составляет от 3 до 4). Образцы анализировали с использованием длинной стандартной кривой с использованием 10 стандартов. Образцы плазмы осаждали белком и разбавляли с использованием системы обработки жидкости после анализа с использованием LC-MS/MS.

Анализ.

Подготовка стандартных образцов.

Обычно подготавливали два отдельных набора стандартов со следующими уровнями концентрации: 1, 3, 10, 100, 300, 1000, 3000, 5000 и 10000 нг/мл. Первый набор стандартных образцов был проанализирован в начале цикла и использовался для калибровки. Второй набор стандартных образцов был проанализирован в конце цикла и использовался в качестве контроля качества.

Подготовка образцов плазмы:

50 мкл плазмы осаждали 150 мкл внутреннего стандарта в ацетонитриле.

После центрифугирования 25 мин при 5°C и 16000 g (пробирки Эппендорфа) или микротитровальный планшет на 3000 г (МТР).

50 мкл супернатанта и 150 Milli-Q воды были перенесены во флакон для HPLC/МТР.

Результаты.

Критерии приемлемости.

Допускается отклонение каждой точки на калибровочных кривых на 15% от номинального значения (LLOQ (нижний предел количественного обнаружения) может отличаться на 20%). Точку можно

исключить, если она расходится сильнее. Стандартная кривая должна содержать как минимум 5 точек, и две последовательные точки не могут быть исключены. QC (контроль качества) имеет те же критерии приемлемости, что и стандартные образцы на калибровочной кривой.

Фармакокинетические параметры рассчитывались в WinNonlin.

Таблица 2

Фармакокинетические параметры
соединение 1 добавляли в прозрачный раствор 30% HP-Beta-CD и 5% DMSO

Способ введения	Доза (мг/кг)	AUC (площадь под кривой)	C ₀ (нг/мл)	T _{1/2} (h)	Cl л/ч/кг	V _z (объем распределения в терминальной фазе выведения) л/кг	Артериальное давление
		ошибок (0-8 ч) (ч*нг/мл)					
в/в (внутривенно)	0,5	985	861	4,3	0,38	2,4	0,5

Таблица 3

Фармакокинетические параметры
соединение 1 добавляли в прозрачный раствор 30% HP-Beta-CD и 5% DMSO

Доза (мг/кг)	AUC (0–24 ч) (ч*нг/мл)	C _{max} (максимальная концентрация) (нг/мл)	T _{max} (время достижения максимальной концентрации) (ч)	Артериальное давление 3 ч
1	1134*	163	4	0,4
3	8005	552	6	0,5
10	34528	2267	8	0,5
30	98537	6591	4	0,6

*AUC рассчитана в 0-8 ч, концентрация через 8 ч составила 149 нг/мл.

Выводы.

Соединение 1 демонстрирует длительный период полувыведения и низкий клиренс у крыс. Соединение 1 также демонстрирует линейность дозы (C_{max}), высокую экспозицию в плазме и высокую экспозицию.

Пример 11: Исследование внутреннего клиренса с использованием гепатоцитов человека и крысы.

В этом анализе соединение 1 инкубировали с криоконсервированными гепатоцитами для различных временных точек и исчезновение соединения 1 отслеживали с помощью LC-MS/MS.

Условия, использованные в анализе, кратко изложены ниже.

Концентрация соединения в анализе: 1 мкМ.

Время инкубации с гепатоцитами: 0, 15, 30, 60, 90 и 120 мин при 37°C с 5% CO₂.

Плотность гепатоцитов: 106 клеток/мл.

Объем анализа: 500 мкл.

Количество повторностей: 2.

Контрольное соединение: Тестостерон (высокий клиренс).

Результаты.

Таблица 4
Клиренс гепатоцитов у человека и крысы

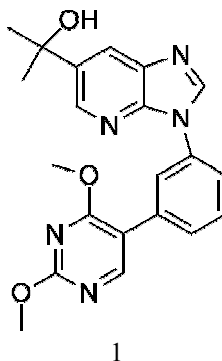
Клиренс гепатоцитов	
Вид	Cl _{int} in vivo (внутренний клиренс in vivo) (мкл/мин миллион клеток)
Человек	1,87
Крыса	2,11

Выводы.

Соединение 1 имеет низкий клиренс в гепатоцитах человека и крысы.

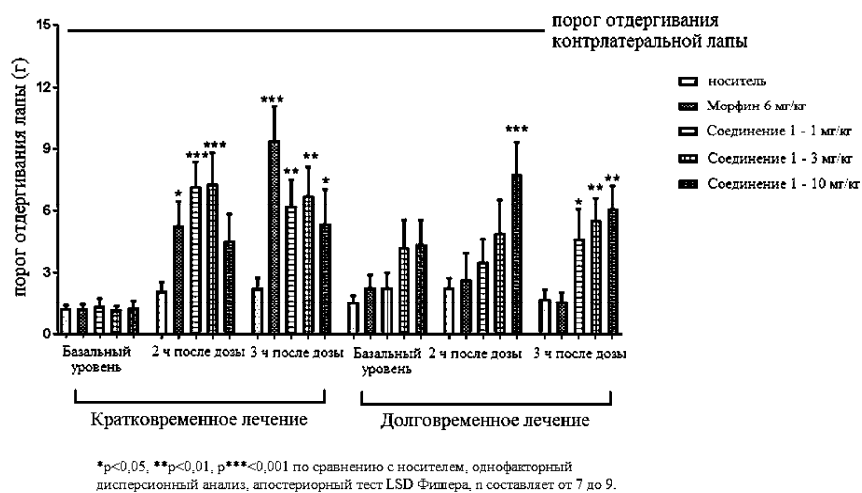
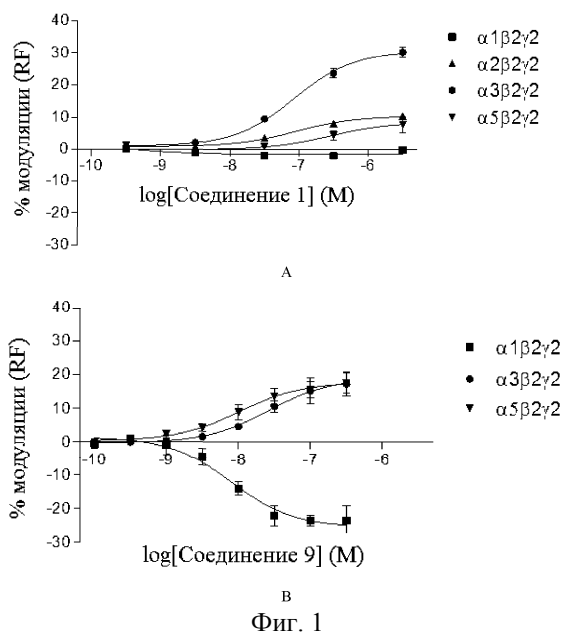
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы 1:

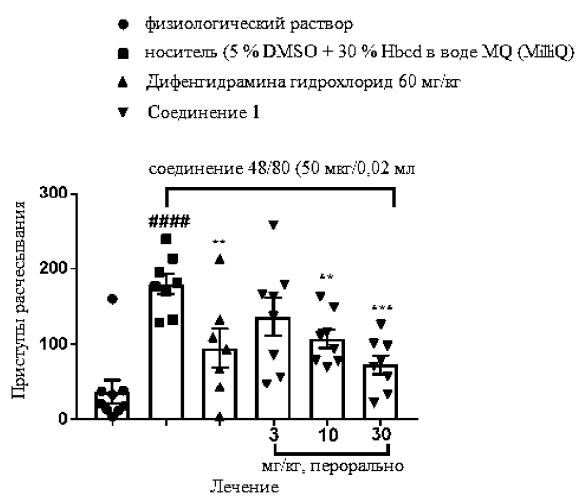


или его фармацевтически приемлемая соль.

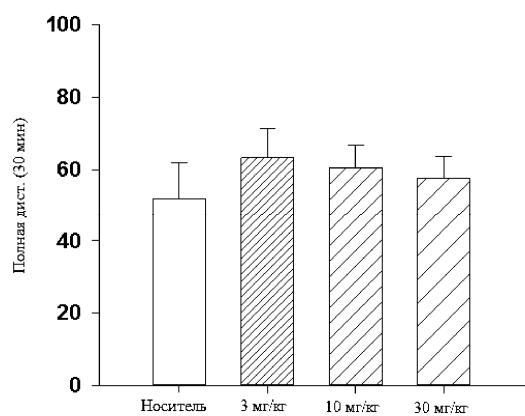
2. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество соединения по п.1.
3. Применение соединения по п.1 для лечения нейропатической боли.
4. Применение по п.3, где нейропатическая боль представляет собой аллодинию.
5. Применение соединения по п.1 для лечения зуда.
6. Применение по п.5, где зуд представляет собой прурит.
7. Применение по п.5, где зуд вызван кожным заболеванием.
8. Применение по п.7, где кожное заболевание представляет собой псориаз.
9. Применение по п.7, где кожное заболевание представляет собой экзему.
10. Способ лечения нейропатической боли и/или зуда, включающий введение соединения по п.1 нуждающемуся в этом индивидууму.
11. Применение соединения по п.1 при производстве лекарственного средства для лечения нейропатической боли и/или зуда.



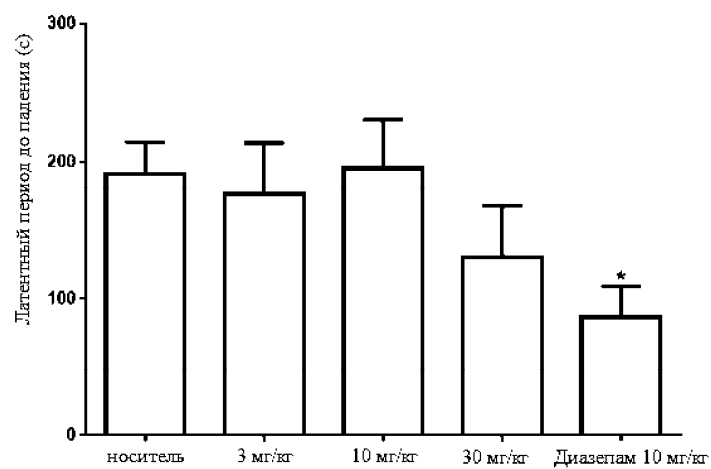
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



* $p < 0,05$, по сравнению с носителем, однофакторный дисперсионный анализ с заключительным LSD тестом Фишера, n составляет от 6 до 7

Фиг. 5

