

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044574**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.09.07

(51) Int. Cl. *A61K 31/4178* (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201991188

(22) Дата подачи заявки
2018.05.24

(54) **НОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ ГЛУТАМИНИЛЦИКЛАЗ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

(31) **2017118350; 2017137615**

(32) **2017.05.26; 2017.10.27**

(33) **RU**

(43) **2020.04.15**

(86) **PCT/RU2018/050058**

(87) **WO 2018/217139 2018.11.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ФАРМИНТЕРПРАЙСЕЗ" (RU)**

(56) **US-A1-2016031858**

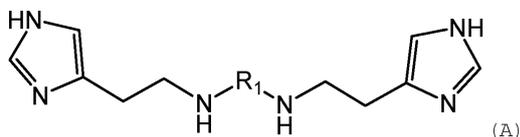
MIKHAIL A. Podyminogin et al. Synthetic RNA-cleaving molecules mimicking ribonuclease A active center. Design and cleavage of tRNA transcripts. *Nucleic Acids Research*. 1993. Vol. 21, No.25 p.5950-5956

Elfriede Schuhmann, et al. Bis[platinum(II)] and Bis[palladium(II)] Complexes of α,ω -Dicarboxylic Acid Bis(1,2,4-triaminobutane-N4) Amides. - *Inorg. Chem.*-1995.-34.-P. 2316-2322

(72) Изобретатель:
**Небольсин Владимир Евгеньевич,
Кромова Татьяна Александровна,
Рыдловская Анастасия Владимировна
(RU)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к химии органических соединений, фармакологии и медицине и касается терапии заболеваний, связанных с aberrантной активностью клеток иммунной системы, в частности для терапии заболеваний легких, дыхательных путей и брюшной полости, лучевой болезни и болевого синдрома, а также других заболеваний посредством применения соединений формулы (A)



в которой R_1 представляет собой группу $-C(O)-R_2-C(O)-$ или $-R_2-C(O)-$, где R_2 представляет собой группу $-(CH_2)_n-$, необязательно замещенную одним или двумя C_1-C_6 алкилами, или фенил, n представляет собой целое число от 0 до 4; причем соединения выбраны из группы, состоящей из группы соединений, как представлено в описании. Данные соединения, а также их фармацевтически приемлемые соли, обладают высокой эффективностью в ингибировании глутаминилциклазы, вовлеченной, в частности, в процессы пост-трансляционной модификации хемокинов и хемотаксиса моноцитов, макрофагов и других клеток иммунной системы. Данное изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим терапевтически эффективное количество соединений формулы (A), определенной выше.

044574 B1

044574 B1

Область техники

Данное изобретение относится к химии органических соединений, фармакологии и медицине и касается терапии заболеваний, связанных с aberrантной активностью клеток иммунной системы, в частности для терапии заболеваний легких, дыхательных путей и брюшной полости. Также настоящее изобретение касается терапии лучевой болезни и болевого синдрома, а так же других заболеваний посредством применения соединений, обладающих эффективностью в ингибировании фермента глутаминилциклазы, вовлеченной, в частности, в процессы пост-трансляционной модификации хемокинов и хемотаксиса клеток иммунной системы.

Уровень техники

Хемотаксис или направленное движение клеток иммунной системы по градиенту концентрации некоторых эндогенных и экзогенных веществ (хемоаттрактантов) является одной из важнейших составных частей функционирования клеток иммунной системы. Избыточный приток клеток иммунной системы как правило вызывает избыточную активность клеток иммунной системы и повреждению окружающих органов и тканей. Понимание участников и процессов, связанных с процессом хемотаксиса, на молекулярном уровне может привести к новым эффективным подходам в лечении и профилактике целого ряда заболеваний, связанных с aberrантной активностью клеток иммунной системы.

Хемокины семейства CCL (CCL2, CCL7, CCL8, CCL13), являющиеся лигандами рецептора CCR2, являются наиболее мощными факторами хемотаксиса моноцитов и макрофагов в организме млекопитающих (Biochem J. 2012 Mar 1; 442(2):403-12). Хемокины семейства CCL составляют важный класс цитокинов, необходимых для активации нейтрофилов и моноцитов и привлечения этих клеток в очаг воспаления. Однако высокие концентрации хемокинов как правило вызывают избыточный приток клеток иммунной системы. Aberrантная активность клеток иммунной системы может привести к серьезным повреждением окружающих органов и тканей. Например, в ряде случаев продукты окисления липидов могут активировать клетки эндотелия сосудов (интиму), что приводит к выделению CCL2, привлечению макрофагов которые, в свою очередь выделяют маркеры воспаления, провоцирующие повреждение артериальной стенки и развитие атеросклероза (Mol Cell. 1998 Aug; 2(2):275-81; Nature. 1998 Aug 27; 394(6696):894-7). Аналогичную патогенетическую картину можно наблюдать в случае радиационно-индуцированного повреждения тканей дыхательных путей: повреждение и активация клеток эпителия легких и дыхательных путей приводит к выделению CCL2, что в свою очередь вызывает экстравазацию иммунных клеток и циркулирующих опухолевых клеток в легкие и дыхательные пути (Antioxid Redox Signal. 2018 Apr 2. doi: 10.1089/ars.2017.7458).

Известна роль хемокинов семейства CCL в патофизиологии целого ряда аутоиммунных и аллергических состояний, опосредованных aberrантной активностью моноцитов CCR2⁺, CD14⁺ и CD16b (ревматоидный артрит, рассеянный склероз). Кроме того, хемокины семейства CCL (в частности CCL2) вовлечены в патогенез ожирения, метаболического синдрома, хронической боли, фиброза, неалкогольной жировой болезни печени и некоторых форм рака.

Подавление aberrантной активности клеток иммунной системы, за счет ингибирования CCL-опосредованного хемотаксиса, может быть крайне востребовано для терапии целого круга заболеваний, таких, как острое повреждение легких (ОПЛ), бронхиальная астма, бронхит, хроническая обструктивная болезнь легких, болезнь Крона, диабетическая нефропатия, и т.д.

Например, в случае диабетической нефропатии воздействие глюкозы в высоких концентрациях приводит к увеличению секреции CCL2 тубулярными клетками почек, что в свою очередь вызывает миграцию моноцитов (Kidney Int. 2006 Jan; 69(1):73-80). Увеличение концентрации моноцитов в тканях почек и их созревание в макрофаги, вызывает развитие aberrантного ответа ассоциированного с выделением большего количества хемокинов и активных форм кислорода, повреждающих окружающие клетки почек (Mediators Inflamm. 2012; 2012:146154). Повреждение ткани почек приводит к развитию и сохранению aberrантной активности клеток иммунной системы и дальнейшему разрушению тканей почек, а блокада взаимодействия CCL2/CCR2 низкомолекулярными антагонистами снижает выраженность патологии (Nephrol Dial Transplant. 2013 Jul; 28(7):1700-10). Аналогичные процессы характерны для патогенеза неалкогольной жировой болезни печени: накопление жирных кислот в клетках печени приводит к активации сигнального пути NF-κB и развитию воспалительной реакции, индуцирующей высвобождение провоспалительных цитокинов, таких как IL-6 и CCL2. Высвобождение провоспалительных цитокинов приводит к миграции моноцитов в очаг воспаления развитие aberrантного ответа ассоциированного с выделением большего количества хемокинов и активных форм кислорода, повреждающих окружающие клетки (Int J Exp Pathol. 2013 Jun; 94(3):217-225).

Члены семейства CCL (CCL2, CCL7, CCL8, CCL13), фракталкин, а также ряда других гормонов и секретлируемых белков, содержат остаток пироглутаминовой кислоты (pE), роль которого заключается в защите от деградации аминопептидазами (Chem Immunol. 1999; 72:42-56; Biochemistry. 1999 Oct 5; 38(40):13013-25). Пироглутаминирование N-концевого остатка катализируется ферментом глутаминилциклазой (QPCT или QC) (J Biol Chem. 2003 Dec 12; 278(50):49773-9; J Mol Biol. 2008 Jun 20; 379(5):966-80). Глутаминилциклаза обладает широкой субстратной специфичностью и участвует в посттрансляционной модификации целого ряда пептидных молекул. В исследованиях субстратной специфичности глу-

таминилциклазы было показано, что фермент может катализировать пироглутаминирование различных субстратов, вне зависимости от длины полипептидной цепи (FEBS Lett. 2004 Apr 9; 563 (1-3):191-6, J Biol Chem. 2011 Apr 8; 286 (14):12439-49).

В ходе экспериментальных исследований было показано, что ингибирование глутаминилциклаз приводит к резкому снижению хемоаттракторной активности непироглутаминированных форм хемокинов CCL2, CCL7, CCL8 и CCL13 (Biochem. J. (2012) 442, 403-412) и фракталкина (Biosci Rep. 2017 Aug 23; 37(4)). Таким образом ингибиторы глутаминилциклазы очевидно могут применяться для терапии широкого круга заболеваний, и в частности, заболеваний легких и дыхательных путей, таких, как бронхиальная астма, острый и хронический бронхит, фарингит, эмфизема легкого, ринит, риносинусит и хроническая обструктивная болезнь легких. Патогенез указанных заболеваний связан с избыточным производством цитокинов и в частности моноцитарных хемоаттрактантных белков CCL2 и CCL7 (Am J Respir Cell Mol Biol. 2014 Jan; 50 (1):144-57) и фракталкина (Expert Opin Ther Targets. 2010 Feb; 14(2):207-19), являющихся субстратами глутаминилциклазы (Biosci Rep. 2017 Aug 23; 37(4). pii: BSR20170712; EMBO Mol Med. 2011 Sep; 3(9):545-58). Было показано, что нейтрализации CCL2 и CCL7 с использованием антител значительно уменьшает приток лейкоцитов, моноцитов и нейтрофилов в дыхательные пути экспериментальных животных (Am J Respir Cell Mol Biol. 2014 Jan; 50(1):144-57).

Воздействие бактериальных липополисахаридов, липотейхоевой кислоты или других раздражителей на слизистую оболочку органов дыхательной системы приводит к увеличению секреции CCL2 клетками гладкой мускулатуры бронхов (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2012 Apr 15; 302(8):L785-92) и росту концентрации CCL2 в бронхоальвеолярном лаваже (Mol Immunol. 2011 Jul; 48(12-13):1468-76). Увеличение концентрации CCL2 в свою очередь вызывает миграцию эозинофилов, моноцитов и базофилов и развитие aberrантного ответа, ассоциированного с выделением большего количества хемокинов (TNF α , IL-1, IL-6, IL-4) и активных форм кислорода, повреждающих окружающие клетки бронхов и органов дыхания (Immunobiology. 2016 Feb; 221(2):182-7; Int J Biol Sci. 2012; 8(9):1281-90; Mol Immunol. 2013 Nov; 56(1-2):57-63). Повреждение бронхов приводит к развитию и сохранению aberrантной активности клеток иммунной системы, и дальнейшему разрушению тканей органов дыхания. В *in vivo* моделях аллергической астмы блокада взаимодействия CCL2/CCR2 низкомолекулярными антагонистами показала значительную эффективность (Int Arch Allergy Immunol. 2015; 166(1):52-62).

Важно отметить, что CCL2-опосредованное развитие нейтрофильного воспаления развитие aberrантного ответа, ассоциированного с выделением пирогенных цитокинов (TNF α , IL-1, IL-6) приводит к повышению температуры и развитию лихорадки (J Infect Dis. 1999 Mar; 179 Suppl 2:S294-304; Front Biosci. 2004 May 1; 9:1433-49).

Помимо лихорадки и повышенной температуры, болевой синдром так же является крайне распространенным симптомом различных заболеваний. Очевидно, что снижение выраженности aberrантного ответа ассоциированного с выделением большего количества активных форм кислорода, повреждающих окружающие ткани, само по себе должно приводить к снижению выраженности болевого синдрома. Однако в недавних работах была показана ключевая роль фракталкина в патогенезе хронической боли (J Neurochem. 2017 May; 141(4):520-531).

Ингибиторы глутаминилциклазы могут применяться для терапии различных аутоиммунных заболеваний, в частности ревматоидного артрита и псориаза.

Фракталкин, являясь одним из ключевых провоспалительных медиаторов, участвующих в развитии аутоиммунных заболеваний. Взаимодействие между фракталкином и его уникальным рецептором (CX3CR1) индуцирует клеточную адгезию, хемотаксис и выживаемость клеток (Mol Interv. 2010 Oct; 10(5):263-70). Уровень фракталкина повышен у пациентов с ревматоидным артритом (РА) (Mod Rheumatol. 2017 May; 27 (3):392-397) и псориазом (Ann Clin Lab Sci. 2015 Fall; 45(5):556-61) коррелирует с активностью заболевания. Фракталкин экспрессируется на фибробластоподобных синовиоцитах и эндотелиальных клетках в синовиальной ткани пациентов с ревматоидным артритом. При псориазе, высокие уровни продукции фракталкина наблюдаются в дермальных сосочках и у антигенпредставляющих клеток (Br J Dermatol. 2001 Jun; 144(6):1105-13). Экспрессия фракталкина усиливается фактором некроза опухоли- α и интерфероном- γ и при ревматоидном артрите, способствует миграции моноцитов, Т-клеток и предшественников остеокластов в синовиальную ткань (Mod Rheumatol. 2017 May; 27(3):392-397). Повышенная экспрессия фракталкина у дермальных сосочков дает правдоподобное объяснение миграции и накопления Т-клеток в этих местах при псориазе (Br J Dermatol. 2001 Jun; 144(6):1105-13). Фракталкин также индуцирует образование воспалительных медиаторов макрофагами, Т-клетками и фибробластоподобными синовиоцитами. Более того, фракталкин способствует ангиогенезу и остеокластогенезу. В модели коллаген-индуцированного артрита у мышей использование антител к фракталкину позволило существенно облегчить течение патологии (Mod Rheumatol. 2017 May; 27(3):392-397).

На основании результатов недавних научных исследований можно утверждать, что ингибирование CCL-опосредованного хемотаксиса является новым перспективным терапевтическим подходом к лечению лучевой болезни (Antioxid Redox Signal. 2018 Apr 2. doi: 10.1089/ars.2017.7458, Int J Radiat Biol. 2015 Jun; 91(6):510-8). В моделях на животных было показано, что выраженность радиационно-

индуцированной дисфункции сосудов может быть эффективно снижена за счет ингибирования CCL-опосредованных сигнальных путей. Использование животных, нокаутных по гену рецептора CCL2, равно как при использовании антагонистов указанного рецептора блокирует радиационно-индуцированное изменение морфологии и деструкцию эндотелиальных клеток, и предотвращает развитие воспаления дыхательных путей непосредственно после радиационного облучения (Antioxid Redox Signal. 2018 Apr 2. doi: 10.1089/ars.2017.7458). Более того, подавление CCL-опосредованных сигнальных путей позволяет существенно снизить выраженность радиационно-индуцированного фиброза легких, являющегося одним из основных «отложенных» побочных эффектов радиационного облучения.

Таким образом, на основании литературных данных можно заключить, что стратегия, направленная на ингибирование глутаминилциклазы, является возможным подходом к лечению аутоиммунных заболеваний, ожирения, заболеваний легких, дыхательных путей и брюшной полости, лучевой болезни и болевого синдрома.

К настоящему времени известны ингибиторы глутаминилциклазы, включающие сульфолипиды (WO 2017/046256), производные флавоноидов (Bioorg Med Chem. 2016 May 15; 24(10):2280-6), производные пиридина (US 2015/0291632) и некоторые небольшие молекулы, описанные в работах последнего времени (J Med Chem. 2017 Mar 23; 60(6):2573-2590; WO 2014/193974, US 2015/0291557). Наиболее близкие аналоги соединения, являющегося предметом настоящего изобретения, приведены в публикациях компании Probiodrugs Aktiengesellschaft (J Biol Chem. 2003 Dec 12; 278(50):49773-9). В данной работе описаны ингибиторы глутаминилциклазы на основе производных имидазола. Однако, в структурах соединений, опубликованных компанией Probiodrugs Aktiengesellschaft, имидазол содержит алифатический заместитель по одному из атомов азота имидазольного цикла. Введение алифатического заместителя снижает метаболическую стабильность соединений. Кроме того, введение алифатического заместителя увеличивает гидрофобность соединений и облегчает проникновение соединения через гематоэнцефалический барьер, что явно излишне для подавления aberrантной активности клеток иммунной системы и потенциально может привести к возникновению побочных эффектов.

На сегодняшний день нет ни одного препарата, действующего как ингибитор глутаминилциклазы, который бы применяли в терапии заболеваний, связанных с aberrантной активностью клеток иммунной системы, поэтому сохраняется потребность в создании и внедрении для использования в терапии новых эффективных лекарственных средств на основе ингибиторов глутаминилциклазы.

Данное изобретение касается применения химических соединений, обладающего эффективностью в ингибировании глутаминилциклазы, в терапии заболеваний дыхательных путей и брюшной полости, лучевой болезни и различных видов болевого синдрома, а также других заболеваний, связанных с aberrантной активностью клеток иммунной системы.

Краткое описание фигур

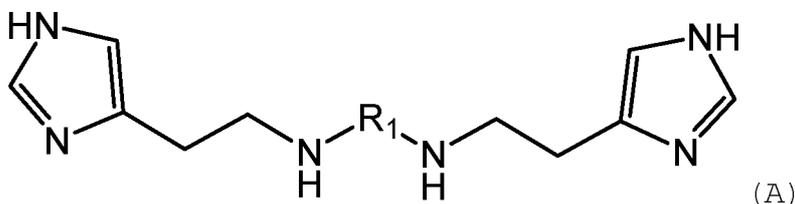
Фигура - Приток клеток воспаления в бронхоальвеолярное пространство при изучении специфической фармакологической активности соединения 1 на модели острой астмы у морских свинок ($M \pm m$, $n=10$).

Раскрытие изобретения

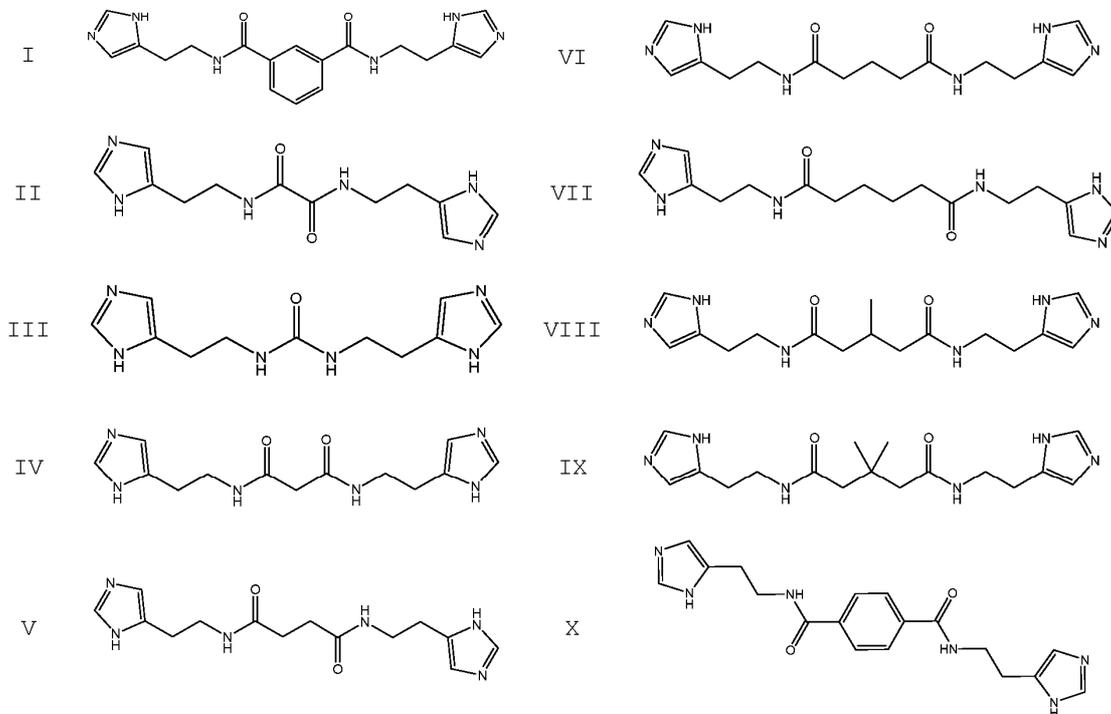
Задачей настоящего изобретения является разработка новых лекарственных средств, являющихся ингибиторами глутаминилциклазы и эффективных для лечения заболеваний, связанных с aberrантной активностью клеток иммунной системы, в особенности заболеваний легких, дыхательных путей и брюшной полости, лучевой болезни и болевого синдрома, а также прочих заболеваний, связанных с aberrантной активностью клеток иммунной системы.

Техническим результатом данного изобретения является разработка и получение эффективных ингибиторов глутаминилциклазы, характеризующихся высокой ингибирующей активностью, позволяющей использовать данные ингибиторы для лечения заболеваний, связанных с aberrантной активностью клеток иммунной системы, в частности заболеваний легких и дыхательных путей, таких как бронхиальная астма, острый и хронический бронхит, фарингит, ринит (в частности аллергический ринит), риносинусит, хроническая обструктивная болезнь легких и ее проявления (в частности эмфизема легкого, бронхиальная обструкция); заболеваний органов брюшной полости, таких как болезнь Крона, язвенный колит, перитониты и нефропатии (в частности диабетической нефропатии); лучевой болезни и болевого синдрома, а так же прочих заболеваний связанных с aberrантной активностью клеток иммунной системы, в частности с aberrантным хемотаксисом клеток иммунной системы.

Указанный технический результат достигается путем применения соединений формулы (A)



в которой
 R_1 представляет собой группу $-C(O)-R_2-C(O)-$ или $-R_2-C(O)-$, где
 R_2 представляет собой группу $-(CH_2)_n-$, необязательно замещенную одним или двумя C_1-C_6 алкилами, или фенил,
 n представляет собой целое число от 0 до 4;
при этом указанные соединения формулы (A) выбраны из группы, состоящей из любого из соединений I-X, и их комбинаций



или их фармацевтически приемлемых солей, гидратов, сольватов, в качестве ингибиторов глутаминилциклазы.

Указанный технический результат достигается также посредством применения соединений формулы (A), выбранных из любого из соединений I-X или их фармацевтически приемлемых солей, гидратов, сольватов для получения фармацевтической композиции для предупреждения и/или лечения расстройства, связанного с активностью глутаминилциклазы.

Указанный технический результат достигается также посредством применения любого из соединений I-X или их солей, гидратов, сольватов для получения фармацевтической композиции для предупреждения и/или лечения расстройства, связанного с aberrантной активностью клеток иммунной системы, в частности с aberrантным хемотаксисом клеток иммунной системы.

Кроме того, изобретение предусматривает фармацевтические композиции для предупреждения и/или лечения расстройства, связанного с активностью глутаминилциклазы и/или с aberrантной активностью клеток иммунной системы, в частности с aberrантным хемотаксисом клеток иммунной системы, и характеризующиеся тем, что они содержат эффективное количество соединения по изобретению и, по меньшей мере, одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах воплощения изобретения вспомогательное вещество представляет собой фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

Изобретение также включает способ предупреждения и/или лечения расстройства, связанного с активностью глутаминилциклазы в организме, включающий введение в указанный организм фармацевтической композиции по изобретению. Такое расстройство, связанное с активностью глутаминилциклазы, представляет собой заболевание, связанное с aberrантной активностью клеток иммунной системы, в частности с aberrантным хемотаксисом клеток иммунной системы, в особенности заболевание легких и дыхательных путей. В некоторых неограничивающих вариантах воплощения изобретения заболевание легких и дыхательных путей представляет собой бронхиальную астму, острый и хронический бронхит, фарингит, эмфизему легкого, ринит, риносинусит или хроническую обструктивную болезнь легких. В частных случаях воплощения изобретения организм представляет собой человека или животного.

Подробное раскрытие изобретения

Получение соединений I-X, как и ряда других химических соединений, описано в заявке на изобретение RU 2013/116822. В указанной патентной заявке описаны производные бисамидов дикарбоновых кислот, обладающие способностью к комплексообразованию или хелатированию ионов металлов, а также их применение в качестве средства для профилактики и/или лечения вирусного гепатита, ВИЧ-

инфекции, онкологических, нейродегенеративных, сердечнососудистых, воспалительных заболеваний, диабета, геронтологических заболеваний, заболеваний, вызываемых токсинами микроорганизмов, а также алкоголизма, алкогольного цирроза печени, анемии, поздней порфирии, отравлений солями переходных металлов.

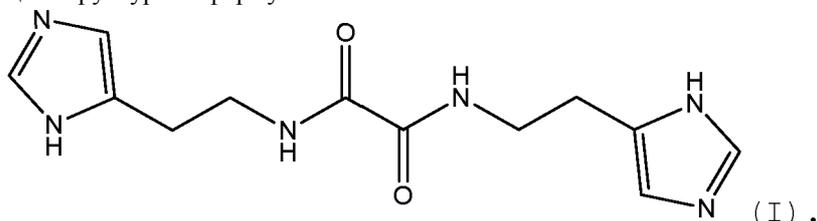
В ходе исследований специфической фармакологической активности соединения формулы (А) авторами настоящего изобретения было неожиданно обнаружено, что соединения формулы (А) влияют на хемотаксис клеток иммунной системы. Снижение притока клеток иммунной системы может применяться в терапии целого ряда заболеваний, связанных с aberrантной активностью клеток иммунной системы, в частности заболеваний легких и дыхательных путей, таких как бронхиальная астма, острый и хронический бронхит, фарингит, ринит (в частности аллергический ринит), риносинусит, хроническая обструктивная болезнь легких и ее проявления (в частности эмфизема легкого, бронхиальная обструкция); а так же заболеваний органов брюшной полости, таких как болезнь Крона, язвенный колит, перитониты и нефропатии (в частности диабетической нефропатии); и лучевой болезни.

Поскольку влияние на хемотаксис не может быть предсказано или объяснено способностью соединения к комплексообразованию или хелатированию ионов металлов, была предпринята попытка поиска возможных терапевтических мишеней. В ходе исследований автора настоящего изобретения обнаружили, что наблюдаемый терапевтический эффект соединений формулы (А) связан со способностью данных соединений подавлять активность глутаминилциклазы. В ходе дальнейших исследований способность подавлять активность глутаминилциклазы была показана также для соединений III, IV, V, VI, VII, VIII, IX и X.

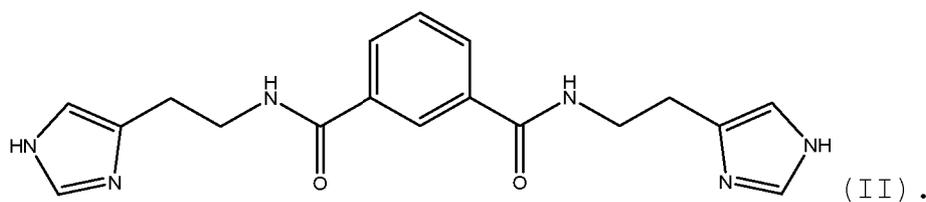
Таким образом, соединения I-X являются новыми ингибиторами глутаминилциклазы, которые влияют на хемотаксис клеток иммунной системы и могут применяться для терапии заболеваний, связанных с aberrантной активностью клеток иммунной системы, в частности заболеваний легких и дыхательных путей, таких как таких как бронхиальная астма, острый и хронический бронхит, фарингит, ринит (в частности аллергический ринит), риносинусит, хроническая обструктивная болезнь легких и ее проявления (в частности эмфизема легкого, бронхиальная обструкция); а так же заболеваний органов брюшной полости, таких как болезнь Крона, язвенный колит, перитониты и нефропатии (в частности диабетической нефропатии); а также лучевой болезни и болевого синдрома.

Термины и определения

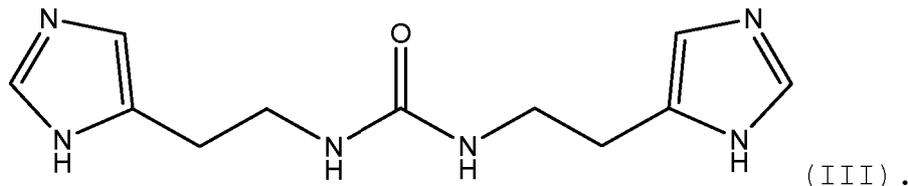
Термин "Соединение I" относится к N,N'-бис[2-(1H-имидазол-4-ил)этил]оксаламиду, соответствующему следующей структурной формуле:



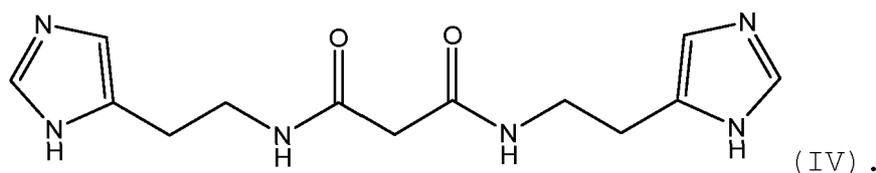
Термин "Соединение II" относится к N,N'-бис[2-(1H-имидазол-4-ил)этил]изофталамиду, соответствующему следующей структурной формуле:



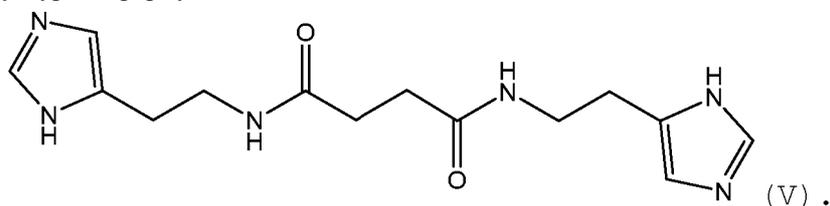
Термин "Соединение III" относится к N,N'-бис[2-(1H-имидазол-4-ил)этил]карбамиду, также представленному структурной формулой:



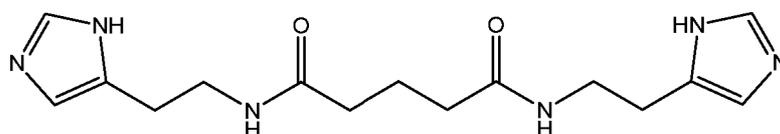
Термин "Соединение IV" относится к N,N'-бис[2-(1H-имидазол-4-ил)этил]малонамиду, также представленному структурной формулой:



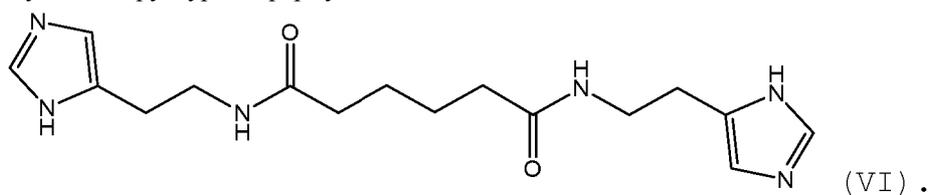
Термин "Соединение V" относится к N,N'-бис[2-(1H-имидазол-4-ил)этил]сукцинамиду, также представленному структурной формулой:



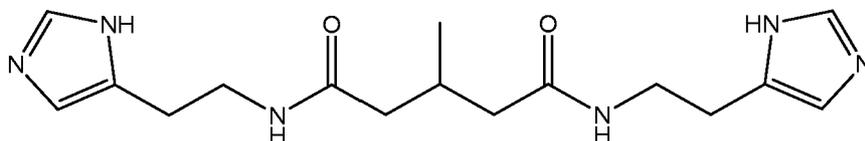
Термин "Соединение VI" относится к N,N'-бис[2-(1H-имидазол-4-ил)этил]глутараимиду, соответствующему следующей структурной формуле:



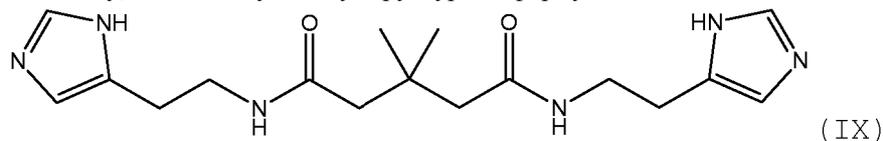
Термин "Соединение VII" относится к N,N'-бис[2-(1H-имидазол-4-ил)этил] адипамиду, соответствующему следующей структурной формуле:



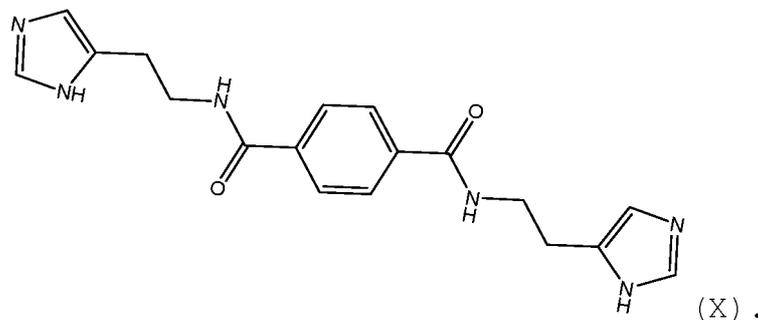
Термин "Соединение VIII" относится к N,N'-бис[2-(1H-имидазол-4-ил)этил]-3-метилпентанедиамиду, соответствующему структурной формуле:



Термин "Соединение IX" относится к N,N'-бис[2-(1H-имидазол-4-ил)этил]-3,3-диметилпентанедиамиду, соответствующему структурной формуле:



Термин "Соединение X" относится к N,N'-бис[2-(1H-имидазол-4-ил)этил]терефталамиду, соответствующему следующей структурной формуле:



Термин "С", когда он используется со ссылкой на температуру, означает стоградусную шкалу или температурную шкалу Цельсия.

Термин "IC₅₀" означает концентрацию тестируемого соединения, при которой достигается полумаксимальное ингибирование фермента.

Термин "фармацевтически приемлемые соли" или "соли" включает соли активных соединений, которые получены с помощью относительно нетоксичных кислот. Примерами фармацевтически приемлемых нетоксичных солей могут служить соли, образованные неорганическими кислотами, такими как соляная, бромоводородная, фосфорная, серная и хлорная кислоты, или органическими кислотами, такими как уксусная, щавелевая, малеиновая, винная, янтарная, лимонная или малоновая кислоты, или полученные другими методами, используемыми в данной области, например, с помощью ионного обмена. К другим фармацевтически приемлемым солям относятся адипинат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, fumarat, глюкогептонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептанат, гексанат, гидройодид, 2-гидрокси-этансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурил сульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат (мезилат), 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, полуфумарат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, п-толуолсульфонат (тозилат), ундеканат, валериат и подобные.

Термин "сольват" используется для описания молекулярного комплекса, содержащего соединение по изобретению и одну или более молекул фармацевтически приемлемого растворителя, например этанола. Термин "гидрат" используется, когда указанным растворителем является вода.

Термин "аберрантная активность" клеток иммунной системы в настоящем документе означает активность, существенно отличающуюся от базового уровня активности клеток иммунной системы в организме при отсутствии патологии. Аберрантная активность может быть вызвана избыточным притоком клеток иммунной системы к органу или ткани, нарушением процессов, приводящих к активации клеток иммунной системы, дерегулированием процессов связанных с гибелью клеток иммунной системы, а также другими факторами.

Термин "вспомогательное вещество" означает любое фармацевтически приемлемое вещество неорганического или органического происхождения, входящее в состав лекарственного препарата или используемое в процессе производства, изготовления лекарственного препарата для придания ему необходимых физико-химических свойств.

Термин "среда RPMI" (англ. Roswell Park Memorial Institute medium) означает среду для культур клеток и тканей. RPMI традиционно используется для выращивания лимфоидных клеток человека. Среда содержит значительное количество фосфата и имеет состав для выращивания в атмосфере с содержанием углекислого газа 5%.

Термин "глутаминилциклаза" означает фермент аминоксилтрансферазу участвующую в преобразовании N-концевой глутамина в пироглутамин в различных пептидных субстратах. Образование N-концевого пироглутамата защищает биологически активные пептиды, гормоны и хемокины (например, тиреотропин-высвобождающий гормон, β -хемокиновый лиганд-2) от деградации экзопептидазами и в некоторых случаях может увеличивать аффинность лигандов к их рецепторам.

Термин "хемотаксис" означает направленное движение клеток в ответ на химический раздражитель. В основе хемотаксиса лежит способность клетки отвечать на градиент концентрации хемотаксического медиатора. Хемотаксис является тем процессом, благодаря которому клетки иммунной системы покидают сосудистое русло и мигрируют в поврежденную ткань. Ведущую роль в хемотаксисе играют хемотаксические вещества (хемотрактанты). Одним из наиболее мощных хемотрактантов для моноцитов и макрофагов является хемокин CCL2.

Термины "лечение", "терапия" охватывают лечение патологических состояний у млекопитающих, предпочтительно у человека, и включают: а) снижение, б) блокирование (приостановку) течения заболевания, в) облегчение тяжести заболевания, т.е. индукцию регрессии заболевания, г) реверсирование заболевания или состояния, к которому данный термин применяется, или одного или более симптомов данного заболевания или состояния.

Термин "профилактика", "предотвращение" охватывает устранение факторов риска, а также профилактическое лечение субклинических стадий заболевания у млекопитающих, предпочтительно у человека, направленное на уменьшение вероятности возникновения клинических стадий заболевания. Пациенты для профилактической терапии отбираются на основе факторов, которые, на основании известных данных, влекут увеличение риска возникновения клинических стадий заболевания по сравнению с общим населением. К профилактической терапии относится а) первичная профилактика и б) вторичная профилактика. Первичная профилактика определяется как профилактическое лечение у пациентов, клиническая стадия заболевания у которых еще не наступила. Вторичная профилактика - это предотвращение повторного наступления того же или близкого клинического состояния заболевания.

Соединения I-X перспективны для лечения заболеваний, связанных с аберрантной активностью клеток иммунной системы, в особенности заболеваний, связанных с аберрантным хемотаксисом клеток иммунной системы, в частности для терапии заболеваний легких и дыхательных путей, таких как бронхиальная астма, острый и хронический бронхит, фарингит, ринит (в частности аллергический ринит), риносинусит, хроническая обструктивная болезнь легких и ее проявления (в частности эмфизема легкого, бронхиальная обструкция); заболеваний органов брюшной полости, таких как болезнь Крона, язвен-

ный колит, перитониты и нефропатии (в частности диабетической нефропатии); лучевой болезни и болевого синдрома имеющих как системный, так и локальный характер, в том числе, обусловленных первичными патологическими изменениями, или связанных с различными заболеваниями или длительным приемом некоторых лекарственных препаратов. В некоторых частных вариантах соединения по изобретению могут быть использованы для лечения других заболеваний, связанных с aberrантной активностью клеток иммунной системы.

Способ терапевтического применения соединений

Предмет данного изобретения также включает введение субъекту, нуждающемуся в соответствующем лечении, терапевтически эффективного количества одного или нескольких соединений по изобретению. Под терапевтически эффективным количеством подразумевается такое количество одного или нескольких соединений, вводимого или доставляемого пациенту, при котором у пациента с наибольшей вероятностью проявится желаемая реакция на лечение (профилактику). Точное требуемое количество может меняться от субъекта к субъекту в зависимости от возраста, массы тела и общего состояния пациента, тяжести заболевания, методики введения препарата, комбинированного лечения с другими препаратами и т.п.

Соединения по изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая одного или нескольких соединений, может быть введена в организм пациента в любом количестве (предпочтительно, суточная доза действующего вещества составляет до 0,5 г на пациента в сутки, наиболее предпочтительно, суточная доза составляет 5-50 мг/сутки) и любым путем введения (предпочтительно, пероральный путь введения), эффективным для лечения или профилактики заболевания.

После смешения лекарственного препарата с конкретным подходящим фармацевтически допустимым носителем в желаемой дозировке, композиции, составляющие суть изобретения, могут быть введены в организм человека или других животных перорально, парентерально, местно и т.п.

Введение может осуществляться как разово, так и несколько раз в день, неделю (или любой другой временной интервал), или время от времени. Кроме того, одного или нескольких соединений могут вводиться в организм пациента ежедневно в течение определенного периода дней (например, 2-10 дней), а затем следует период без приема вещества (например, 1-30 дней).

В том случае, когда соединения по изобретению используется как часть режима комбинированной терапии, доза каждого из компонентов комбинированной терапии вводится в течение требуемого периода лечения. Соединения, составляющие комбинированную терапию, могут вводиться в организм пациента как одновременно, в виде дозировки, содержащей все компоненты, так и в виде индивидуальных дозировок компонентов.

Фармацевтические композиции

Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, которые содержат формулы (A), в частности, соединения I-X (или пролекарственную форму или другое фармацевтически приемлемое производное) и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, адъювантов, растворителей и/или наполнителей, таких, которые могут быть введены в организм пациента совместно с соединением, составляющим суть данного изобретения, и которые не влияют на фармакологическую активность этого соединения, и являются нетоксичными при введении в дозах, достаточных для доставки терапевтического количества соединения.

Фармацевтические композиции, заявляемые в данном изобретении, содержат одного или нескольких соединений формулы (A) совместно с фармацевтически приемлемыми носителями, которые могут включать в себя любые растворители, разбавители, дисперсии или суспензии, поверхностно-активные вещества, изотонические агенты, загустители и эмульгаторы, консерванты, вяжущие вещества, скользящие материалы и т.д., подходящие для конкретной формы дозирования. Материалы, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, включают, но не ограничиваются, моно- и олигосахаридами, а также их производными; желатин; тальк; эксципиенты, такие как какао-масло и воск для суппозитория; масла, такие как арахисовое, хлопковое, сафроловое, кунжутное, оливковое, кукурузное и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные вещества, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновая кислота; апирогенная вода; изотонический раствор, раствор Рингера; этиловый спирт и фосфатные буферные растворы. Также в составе композиции могут быть другие нетоксичные совместимые скользящие вещества, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, пленкообразователи, подсластители, вкусовые добавки и ароматизаторы, консерванты и антиоксиданты.

Предметом данного изобретения являются также лекарственные формы - класс фармацевтических композиций, состав которых оптимизирован для определенного пути введения в организм в терапевтически эффективной дозе, например, для введения в организм орально, местно, ингаляционно, например, в виде ингаляционного спрея, или внутрисосудистым способом, интраназально, подкожно, внутримышечно, а также инфузионным способом, в рекомендованных дозировках.

Лекарственные формы данного изобретения могут содержать составы, полученные методами использования липосом, методами микрокапсулирования, методами приготовления наноформ препарата, или другими методами, известными в фармацевтике.

При получении композиции, например в форме таблетки, активное начало смешивают с одним или несколькими фармацевтическими эксципиентами, такими как желатин, крахмал, лактоза, стеарат магния, тальк, кремнезем, арабийская камедь, маннит, микрокристаллическая целлюлоза, гипромеллоза или аналогичные соединения.

Таблетки можно покрыть сахарозой, целлюлозным производным или другими веществами, подходящими для нанесения оболочки. Таблетки могут быть получены различными способами, такими как непосредственное сжатие, сухое или влажное гранулирование или горячее сплавление в горячем состоянии.

Фармацевтическую композицию в форме желатиновой капсулы можно получить, смешивая активное начало с другими веществами и заполняя полученной смесью мягкие или твердые капсулы.

Для введения парентеральным путем используются водные суспензии, изотонические солевые растворы или стерильные растворы для инъекций, которые содержат фармакологически совместимые агенты, например пропиленгликоль или бутиленгликоль.

Примеры фармацевтических композиций

Соединения формулы (A), описанные в данном изобретении, могут быть использованы для профилактики и/или лечения болезней человека, или животных в виде следующих составов (под "Веществом" понимается соединение формулы (A)):

Таблетка I мг/таблетка

Вещество 0,5

Микрокристаллическая целлюлоза 66,5

Карбоксиметилкрахмал натрия 2,3

Магния стеарат 0,7

Таблетка II мг/таблетка

Вещество 5,0

Микрокристаллическая целлюлоза 62,0

Карбоксиметилкрахмал натрия 2,3

Магния стеарат 0,7

Таблетка III мг/таблетка

Вещество 50

Микрокристаллическая целлюлоза 620

Карбоксиметилкрахмал натрия 23

Магния стеарат 7

Таблетка IV мг/таблетка

Вещество 50

Лактоза Ph. Eur 223,75

Кроскармеллоза натрия 6,0

Кукурузный крахмал 15

Поливинилпироллидон (5% моб паста) 2,25

Стеарат магния 3,0

Таблетка V мг/таблетка

Вещество 200

Лактоза Ph. Eur 182,75

Кроскармеллоза натрия 12,0

Кукурузный крахмал (5% об. паста) 2,25

Стеарат магния 3,0

Капсула мг/капсула

Вещество 10

Лактоза Ph. Eur 488,5

Магnezия 1,5

Состав для инъекций I (50 мг/мл)

Вещество 5,0% w/v

1M раствор гидроксида натрия 15,0% w/v

1M раствор соляной кислоты до pH 7,6

Полиэтиленгликоль 400 4,5% w/v

Вода для инъекций до 100%

Мазь мл

Вещество 40 мг

Этанол 300 μ л

Вода 300 μ л

1-додецилазациклопептанон 50 μ л

Пропиленгликоль до 1 мл

Данные составы могут быть приготовлены в соответствии со стандартными фармацевтическими методиками. Таблетки (I)-(II) могут быть покрыты кишечнорастворимой оболочкой с использованием, например, фталата ацетата целлюлозы.

Применение соединений I-X в комбинированной терапии

Несмотря на то, что соединения I-X могут вводить в качестве индивидуального активного фармацевтического средства, их также можно использовать в сочетании с одним или несколькими другими агентами, в частности, другой агент может представлять собой антибиотик, НПВС или другое противовоспалительное средство, антигипертензивное средство, глюкокортикостероид, моноклональное антитело и т.д. При совместном приеме внутрь терапевтические агенты могут представлять собой разные лекарственные формы, которые вводятся одновременно или последовательно в разное время, либо терапевтические агенты могут быть объединены в одну лекарственную форму.

Фраза "комбинированная терапия" в отношении соединений данного изобретения в сочетании с другими фармацевтическими агентами, означает одновременный или последовательный прием всех агентов, который так или иначе обеспечит благоприятное воздействие сочетания лекарств. Совместное введение подразумевает, в частности, совместную доставку, например, в одной таблетке, капсуле, инъекции или в другой форме, имеющий фиксированное соотношение активных веществ, также как и одновременную доставку в нескольких, отдельных лекарственных формах для каждого соединения соответственно.

Таким образом, введение соединений I-X может быть осуществлено в сочетании с дополнительными методами лечения, известными специалистам в области профилактики и лечения соответствующих заболеваний, включающими применение антибактериальных, цитостатических и цитотоксических препаратов, препаратов для подавления симптомов или побочных эффектов одного из лекарств.

Если лекарственное средство представляет собой фиксированную дозу, такая комбинация использует соединения данного изобретения в приемлемом дозовом диапазоне. Соединения I-X по данному изобретению также могут быть введены в организм пациента последовательно с другими агентами, в том случае, когда комбинация этих препаратов невозможна. Изобретение не ограничено последовательностью введения; соединения данного изобретения могут быть введены в организм пациента совместно, до или после введения другого препарата.

Примеры

Получение соединений по изобретению

Способы получения соединений I-X раскрыты в заявке на изобретение RU 2013/116822. В той же заявке описана способность подобных соединений к комплексообразованию или хелатированию ионов металлов.

Характеристика биологической активности соединений по изобретению

Биологическая активность соединений I-X была изучена в различных *in vitro* и *in vivo* экспериментах. В частности, при изучении активности соединений I и II в различных *in vitro* и *in vivo* моделях было показано ингибирующее действие соединений I и II на хемотаксис моноцитов, макрофагов и других клеток иммунной системы. Данное биологическое действие соединений I и II не может быть предсказано или объяснено на основе предшествующих знаний о способности соединений I и II к хелатированию ионов металлов.

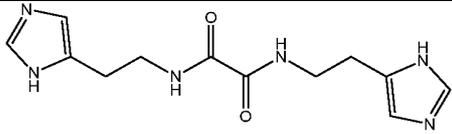
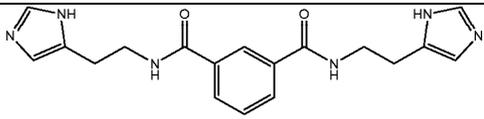
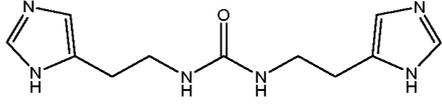
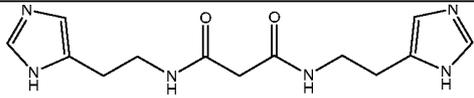
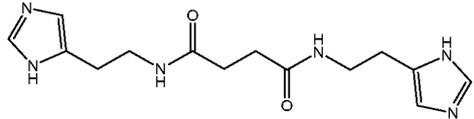
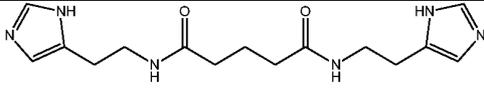
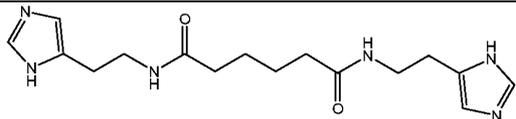
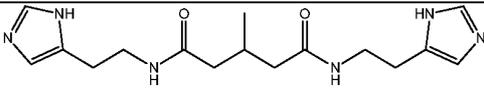
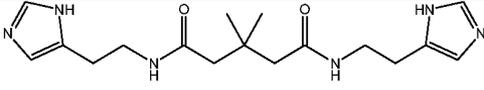
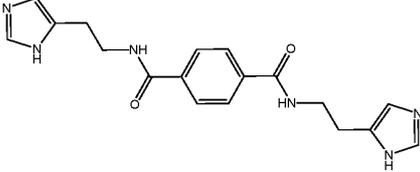
Исследования биологической активности соединений III-X *in vitro*, позволили установить, что соединения III-X так же являются ингибиторами фермента глутаминилциклазы и, таким образом, действие соединений III-X на хемотаксис клеток иммунной системы может быть опосредованно ингибированием активности глутаминилциклазы.

Исследование влияния соединений I-X на ферментативную активность глутаминилциклазы человека *in vitro*.

В ходе исследований влияния соединений I-X, являющихся предметом настоящего изобретения, на ферментативную активность глутаминилциклазы *in vitro* впервые было обнаружено прямое ингибирующее действие соединений I-X на рекомбинантную внутриклеточную глутаминилциклазу человека.

Активность глутаминилциклазы при различных концентрациях соединений I-X изучалась при 25°C с использованием флуоресцентного субстрата L-глутаминил 2-нафтиламида (Gln-bNA) (Anal Biochem. 2002 Apr 1; 303 (1):49-56). Реакционная смесь объемом 100-μл содержала 50 μM флуорогенного субстрата; ~0,2 единицы пироглутаминил аминопептидазы человека (1 единица определяется как количество, гидролизующее 1 микромоляр pGlu-bNA в минуту), и аликвоту рекомбинантной внутриклеточной глутаминилциклазы человека (gQC) в 50 mM трисаминометан-HCl и 5% глицерине, pH 8,0. Реакцию инициировали добавлением к реакционной смеси аликвоты глутаминилциклазы, инкубированной с соединениями I-X в течение 5 мин.

Таблица 1
Влияние соединений I-X на ферментативную активность глутаминилциклазы человека *in vitro*

| № | Соединение | IC ₅₀ , мкМ | K _i , мкМ |
|------|---|------------------------|----------------------|
| I |  | 1.4 | 0.8 |
| II |  | 2.9 | 1.61 |
| III |  | 3.5 | 2 |
| IV |  | 6.3 | 3.50 |
| V |  | 20 | 11 |
| VI |  | 5.4 | 3 |
| VII |  | 4.4 | 2 |
| VIII |  | 7.3 | 4 |
| IX |  | 5.7 | 3.17 |
| X |  | 0.8 | 0.44 |

Дальнейшее протекание реакции отслеживали спектрофотометрически (длина волны возбуждения и эмиссии составляли 320 и 410 нм). Ферментативную активность определяли по количеству выделившегося 2-нафтиламида (bNA), рассчитанному по калибровочной кривой. Значения IC₅₀ рассчитывали с помощью нелинейной регрессии кривой "концентрация ингибитора"- "ферментативная активность". В качестве вещества сравнения использовали известный ингибитор глутаминилциклазы - соединение PBD150 (J Med Chem. 2006 Jan 26; 49(2):664-77).

В результате эксперимента было установлено, что соединения I-X ингибируют активность глутаминилциклазы с IC50 в диапазоне от 0,8 до 20 мкМ (см. табл. 1)

Исследование влияния соединений I и II на миграцию моноцитов *in vitro*

Влияние соединений I и II на миграцию моноцитов *in vitro* было изучено с использованием клеток линии U937, подрощенных до концентрации $(2-3) \times 10^6$ клеток/мл на среде RPMI 1640 с добавлением 10% термоинактивированной фетальной коровьей сыворотки (Biochem J. 2012 Mar 1; 442(2):403-12). Примерно 1×10^7 клеток U937 инкубировали с различными концентрациями соединений I и II (всего 7 концентраций для каждого из соединений) при 37°C в течение 2 ч и затем обрабатывали липополисахаридом E.coli (O111:B4). Супернатант (кондиционированная среда) использовали для изучения миграции моноцитов.

Свежую порцию клеток U937 окрашивали флуоресцентным красителем Calcein AM в течение 1 ч при 37°C. После этого аликвоту окрашенных клеток помещали в верхнее отделение лунок планшета BD Falcon™ HTS FluoroBlock, ячейки которого разделены полупроницаемыми оптически непрозрачными мембранами. В нижнее отделение лунок планшета помещали кондиционированную среду, полученную после инкубирования клеток с ингибитором и липополисахаридом. Планшеты инкубировали 2 ч при 37°C, количество (% относительно эксперимента без ингибитора) клеток, мигрировавших в нижний отсек лунок определяли флуориметрически. В качестве вещества сравнения использовали известный ингибитор глутаминилциклазы - соединение PBD150 (J Med Chem. 2006 Jan 26;49 (2):664-77).

В результате эксперимента было установлено, что соединение I и соединение II в микромолярном диапазоне концентраций оказывают ингибирующий эффект на миграцию моноцитов *in vitro*. Соединение I подавляет миграцию моноцитов в широком диапазоне концентраций от 1 мкМ до 300 мкМ с эффективностью близкой к 60%. В том же диапазоне концентраций соединение II подавляет миграцию моноцитов с эффективностью 50-70%.

Исследование влияния соединения I на хемотаксис лейкоцитов *in vivo* на модели бронхиальной астмы у морских свинок

Индукцию бронхиальной астмы у морских свинок осуществляли по стандартной методике (Current Drug Targets. 2008 Jun; 9(6):452-65). Животных иммунизировали однократным внутрибрюшинным введением 0,5 мл раствора, содержащего 100 мкг/мл овальбумина (Sigma) и 100 мг/мл гидроокиси алюминия. Интактным животным внутрибрюшинно вводили физ. раствор в объеме 0,5 мл.

На 29, 30 и 31 день эксперимента проводили провокацию гиперреактивности дыхательных путей путем ингаляционного введения овальбумина в возрастающих концентрациях - 0,1, 0,3 и 0,5 мг/мл (на 29, 30 и 31 день соответственно). Ингаляцию осуществляли в течение 5 мин или до появления выраженных признаков асфиксии (падение на бок). На 32-ой день животным вводили разрешающую дозу овальбумина - 1 мг/мл в течение 5 мин с оценкой бронхоспастической реакции.

Исследуемое соединение вводили животным внутрижелудочно ежедневно один раз в день в течение 10 суток, заканчивая за 24 ч до введения разрешающей дозы антигена.

Через 24 ч после введения разрешающей дозы овальбумина у животных отбирали бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ). Взятие БАЛ проводили под наркозом путем промывания легких 5-ю мл подогретого до 37°C физиологического раствора через трахею при помощи шприцевого дозатора.

В жидкости бронхоальвеолярного смыва с помощью камеры Горяева подсчитывали абсолютное количество клеточных элементов в 1 мкл смыва. Затем бронхоальвеолярный лаваж центрифугировали при 200 g в течение 10 мин. Из осадка клеток готовили мазки, которые в дальнейшем фиксировали в метаноле и окрашивали по Романовскому-Гимзе для подсчета эндопульмональной цитограммы.

Цитологический анализ бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) выявил многократное увеличение клеточных элементов в БАЛ сенсibilизированных морских свинок (рисунок 1). Таким образом, данная модель характеризуется воспалительной реакцией респираторного тракта экспериментальных животных. Анализ отдельных типов клеток показал, что наиболее выраженный приток клеток приходился на эозинофилы. Полученные результаты подтверждают литературные данные и позволяют сделать заключение о том, что смоделированное воспаление носит аллергический характер.

Ежедневное внутрижелудочное введение соединения I в течение 10 дней снизило приток клеток воспаления в бронхоальвеолярное пространство. Соединение I оказывало терапевтический эффект во всем тестируемом диапазоне доз (0,14-14 мг/кг), снижало как общее количество лейкоцитов, так и количество отдельных клеточных типов: эозинофилов, нейтрофилов, макрофагов (фигура).

При этом на фигуре, знаком * обозначены различия, статистически значимые по сравнению с интактной группой ($p < 0,05$); и знаком - & - различия, статистически значимые по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что соединение I оказывает выраженный терапевтический эффект бронхиальной астме.

Исследование влияния соединения I на хемотаксис макрофагов, нейтрофилов и эозинофилов *in vivo* на модели сефадекс-индуцированного бронхита легких у крыс

Модель сефадекс-индуцированного бронхита легких у крыс реализовали по стандартной методике

(Int Arch Allergy Immunol. 2011; 154(4):286-94). Крысам-самцам линии Вистар однократно ингаляционно вводили Сефадекс G-200 (Pharmacia, Sweden) в дозе 5 мг/кг. Исследуемые соединения вводили животным внутрижелудочно четырехкратно: за 24 и 1 ч до, а также 24 и 45 ч после введения сефадекса. Препарат сравнения будесонид вводили по той же схеме ингаляционно в дозе 0,5 мг/кг. Через 48 ч после ингаляции сефадекса производили забор бронхоальвеолярного лаважа. В лаваже оценивали суммарное количество лейкоцитов и определяли лейкоцитарную формулу.

Анализ бронхоальвеолярного лаважа показал, что однократное ингаляционное введение сефадекса G-200 крысам вызывает выраженный приток лейкоцитов в легкое. Количество всех клеточных типов было увеличено в группе контроля по сравнению с интактными (табл. 2).

Таблица 2

Количество клеточных элементов в бронхоальвеолярном лаваже на модели сефадекс-индуцированного бронхита у крыс ($M \pm m$, $n=10$)

| Группа | Количество клеточных элементов в 1 мкл БАЛ | | | | |
|----------------------------------|--|------------|------------|-----------|-----------|
| | Лейкоциты | Нейтрофилы | Эозинофилы | Макрофаги | Лимфоциты |
| Интактные | 2209±348 | 270±54 | 0±0 | 1975±346 | 0±0 |
| Контроль | 4617±582* | 989±135* | 248±65* | 3209±397* | 0±0 |
| Соединение I (0,18 мг/кг) | 3833±525* | 283±75 & | 0±0 & | 3127±351* | 0±0 |
| Соединение I (1,8 мг/кг) | 4133±454* | 846±101* | 0±0 & | 3287±381* | 0±0 |

Примечания:

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

Внутрижелудочное введение соединения I крысам снизило содержание нейтрофилов и эозинофилов в БАЛ до уровня интактных животных. Полученные результаты свидетельствуют о том, что соединение I оказывает терапевтический эффект при воспалении нижних дыхательных путей, в частности при бронхите.

Исследование активности соединения I на модели неинфекционного воспаления легкого, индуцированного экстрактом сигаретного дыма

Индукцию неинфекционного воспаления легкого мышей осуществляли по стандартной методике [Exp Lung Res. 2013 Feb; 39(1):18-31]. Мышам-самцам линии Balb/c внутрибрюшинно вводили экстракт сигаретного дыма (ЭСД, 0.45 мл/20 мг) на 0, 11, 15, 17, 19 и 22 сутки. ЭСД получали следующим образом: 5 сигарет сжигали, с помощью вакуумного насоса дым фильтровали для удаления частиц и собирали в сосуд, содержащий фосфатно-солевой буфер. Соединение I вводили внутрижелудочно, ежедневно, 1 раз в сутки с 7 по 27 сутки. Эвтаназию проводили на 28 сутки. Правую долю легкого фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, проводили через спирты восходящих концентраций до ксилола и заливали в парафин по стандартной методике. Депарафинизированные срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином и проводили гистологический анализ.

Каждое поражение было оценено по 5-ти бальной шкале: 1 балл - воспалительный инфильтрат занимает 0-20% площади исследуемого гистологического препарата, 2 балла - воспалительный инфильтрат занимает 21-40% площади исследуемого гистологического препарата, 3 балла - воспалительный инфильтрат занимает 41-60% площади исследуемого гистологического препарата, 4 балла воспалительный инфильтрат занимает 61-80% площади исследуемого гистологического препарата, 5 баллов - воспалительный инфильтрат занимает 81-100% площади исследуемого гистологического препарата. Также вычисляли индекс деструкции альвеол (DI) процент поврежденных альвеол относительно общего числа альвеол.

Результаты исследования показали, что многократное внутрибрюшинное введение экстракта сигаретного дыма мышам индуцирует формирование периваскулита, перибронхита, альвеолита и интерстициальной пневмонии (табл. 3).

Внутрижелудочное введение соединения I значительно снизило развитие периваскулита и альвеолита (табл. 3). Полученные результаты позволяют заключить, что соединение I оказывает терапевтический эффект при периваскулите и альвеолите.

Таблица 3

Результаты гистологического исследования на модели неинфекционной пневмонии, индуцированной экстрактом сигаретного дыма ($M \pm m$, $n=12$)

| Группа | Доза соединения, мг/кг | Периваскулит, баллы | Перибронхит, баллы | Альвеолит (DI, %) | Интерстициальная пневмония, баллы |
|--------------|------------------------|---------------------|--------------------|-------------------|-----------------------------------|
| Интактные | - | 0,71±0,20 | 0,51±0,19 | 11,50±1,20 | 0,99±0,20 |
| Контроль | - | 1,50±0,24* | 1,29±0,18 | 30,90±2,30* | 1,81±0,27* |
| Соединение I | 0.3 | 0,38±0,13 & | 1,09±0,24 | 17,70±2,00*& | 1,08±0,26 |

Примечание:

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Исследование активности соединения I in vivo на модели эмфиземы легкого у мышей

Воспаление и эмфизему легких вызывали однократной интратрахеальной инъекцией свиной панкреатической эластазы. Эластазу вводили однократно интратрахеально в дозе 0,6 Ед/мышь в 30 мкл NaCl 0,9%. Для анестезии во время операции использовали пентобарбитал интраперитонеально в дозе 30 мг/кг. Операционное поле дезинфицировали 70% раствором этанола и освобождали от волосяного покрова. По средней линии шеи рассекали кожу, подкожную клетчатку и собственную фасцию шеи. Методом тупого раздвижения тканей раздвигали мышцы на вентральной стороне трахеи. По ходу тока воздуха на вдохе производили инъекцию свиной панкреатической эластазы с помощью шприца Гамильтона. После ушивания раны операционное поле обрабатывали антисептиком. Введение эластазы принимали за 0 день эксперимента.

Соединение I вводили в дозе 3 мг/кг ежедневно внутрижелудочно один раз в сутки на 8-21-е сутки эксперимента. На 21-е сутки исследования животных эвтаназировали в CO₂-камере и выделяли легкие. Для оценки динамики и выраженности развития эмфиземы в ткани легких из левого легкого изготавливались гистологические препараты. Для этого легкое фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и затем заливали в парафин по стандартной методике. Из депарафинизированных срезов получали препараты верхушки легкого, среднего легочного поля и нижнего легочного поля толщиной 5 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Далее делали фотографии верхушки легкого, среднего легочного поля и нижнего легочного поля. С помощью средств компьютерной обработки графических данных исследовали локализацию и площадь эмфизематозно-расширенной ткани легких (% от нормальной ткани), из расчетов исключались сосуды и бронхи (Int J Biomed Imaging. 2012; 2012:734734; Front Physiol. 2015 May 12;6:14).

При гистологическом исследовании на 21 сутки после введения эластазы во всех зонах легкого мышей обнаруживалось умеренно выраженное полнокровие сосудов микроциркулярного русла и капилляров межальвеолярных перегородок. Кроме этого, эластаза приводила к утолщению стенок альвеол за счет лимфо-макрофагальной инфильтрации, а также воспалительной инфильтрации интерстициальной ткани. Просвет отдельных альвеол также заполнен макрофагами и лимфоцитами. В результате действия повреждающего агента на эластические волокна бронхиол, альвеолярных ходов и альвеол в паренхиме легких отмечались растяжение альвеол и разрывы альвеолярных перегородок, развивалась диффузная эмфизема. Анализ препаратов показал, что на 21-е сутки опыта значительная часть ткани левого легкого была занята эмфизематозно-расширенными альвеолами с разрушением межальвеолярных перегородок. Эмфизема локализовалась во всех легочных полях. Наиболее выраженные поражения наблюдались в нижнем легочном поле (табл. 4).

Таблица 4

Площадь эмфизематозно расширенной ткани легких (% от нормальной) у мышей в условиях интратрахеального введения эластазы на 21-е сутки эксперимента ($M \pm m$, $n=5$)

| Группы | Верхнее легочное поле | Среднее легочное поле | Нижнее легочное поле |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| Интактный контроль | 0 | 0 | 0 |
| Патологический контроль | 24,06 ± 6,12* | 63,76 ± 5,02 * | 82,90 ± 2,88 * |
| Соединение I (3 мг/кг) | 11,76 ± 1,48 * | 37,09 ± 5,86 *● | 35,28 ± 5,81 *● |

Примечания:

1 - * - различия достоверны по сравнению с интактным контролем ($p < 0,05$);

2 - ● - различия достоверны по сравнению с патологическим контролем ($p < 0,05$).

Введение соединения I снижало интенсивность воспалительной инфильтрации паренхимы легких и выраженности полнокровия сосудов микроциркуляторного русла и капилляров межальвеолярных перегородок, уменьшало относительную площадь эмфизематозно-расширенных альвеол по сравнению с

группой патологического контроля (табл. 4). Полученные данные дают основание заключить, что соединение II оказывает терапевтический эффект при эмфиземе легкого.

Исследование терапевтической активности соединения I на модели ХОБЛ у морских свинок

Исследование проводили на морских свинках самцах. Хроническую обструктивную болезнь легких вызывали курсовым эндотрахеальным введением липополисахарида клеточной стенки *E. Coli* (ЛПС) и экстрактом табачного дыма (ЭТД) (Biol Pharm Bull. 2009 Sep; 32(9):1559-64). ЭТД получали из сигарет марки Hi-Lite (Япония) (состав 1 сигареты: смола 17 мг/сиг, никотин 1,4 мг/сиг). Перед получением экстракта удаляли сигаретный фильтр, длина сигареты с фильтром 80 мм, при удалении фильтра 55 мм. Экстракцию производили путем протягивания дыма зажженной сигареты через PBS с постоянной скоростью, при помощи вакуумного насоса (40 мл/40 сигарет). Время сжигания одной сигареты составляло 180 с. Для удаления частиц полученный экстракт фильтровали через бактериальный фильтр с величиной поры 45 нм. ЭСД ингалировали морским свинкам (0,3 мл/мин, 40 мин) на ежедневно один раз в сутки на 1-4, 6-9, 11-14, 16-19 сутки. ЛПС ингалировали морским свинкам (25 мкг/мл, 0.3 мл/мин, 1ч) один раз в сутки на 5, 10 и 15е сутки. До последней ингаляции ЭСД, сразу после последней ингаляции ЭСД и через 1,5 ч после последней ингаляции ЭСД проводили оценку функции дыхания (в течение 15 мин). Сразу после оценки функции дыхания проводили забор бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ). Взятие БАЛ проводили под наркозом путем промывания легких 5-ю мл подогретого до 37°C физиологического раствора через трахею при помощи шприцевого дозатора.

В жидкости бронхоальвеолярного смыва с помощью камеры Горяева подсчитывали абсолютное количество клеточных элементов в 1 мкл смыва (цитоз). Затем БАЛ центрифугировали при 200 g в течение 10 мин. Из осадка клеток готовили мазки, которые в дальнейшем фиксировали в метаноле и окрашивали по Романовскому-Гимзе для подсчета эндопальмональной цитогаммы.

Соединение I вводили животным внутрижелудочно ежедневно 1 раз в сутки на 10-19е сутки исследования (последнее введение -за 1 ч до последней ингаляции ЭСД). Группе ложной патологии вместо ЭТД и ЛПС ингалировали физ. раствор. Контрольные животные вместо исследуемого вещества получали растворитель в эквивалентном объеме.

Проведенное исследование показало, что на модели ХОБЛ соединение I снижает приток клеток воспаления в бронхоальвеолярное пространство морских свинок. Наиболее выражено соединение I снижает приток нейтрофилов, макрофагов и эозинофилов (табл. 5).

Таблица 5
Количество клеточных элементов в бронхоальвеолярном лаваже на модели ХОБЛ у морских свинок ($M \pm m$, $n=10$)

| Группы | Количество клеточных элементов в 1 мкл бронхоальвеолярного лаважа | | | | |
|----------------------------|---|------------|------------|------------|-----------|
| | Лейкоциты | Нейтрофилы | Эозинофилы | Макрофаги | Лимфоциты |
| Ложная патология | 2488±154 | 2876±27 | 184±65 | 2016±120 | 48±15 |
| Контроль | 7925±1458# | 1632±319# | 676±187# | 4789±782# | 168±60 |
| Соединение I (0.014 мг/кг) | 2748±174 & | 684±62#& | 171±32 & | 1805±123#& | 88±29 |
| Соединение I (0.14 мг/кг) | 3422±434 & | 937±141# | 287±64 # | 2064±313 & | 134±60 |
| Соединение I (1.4 мг/кг) | 4149±357#& | 931±166# | 245±55 # | 2820±273& | 71±29 |

Примечания:

- отличие от группы ложной патологии по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$;

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что соединение II оказывает выраженное терапевтическое действие при ХОБЛ.

Исследование активности соединения I in vivo на модели аллергического ринита у морских свинок

Модель аллергического ринита реализовали по стандартной методике (Int Immunopharmacol. 2013 Sep; 17(1):18-25). Морских свинок (250-300 гр) иммунизировали 4х кратным (на 0, 7, 14 и 21 сутки) внутрибрюшинным введением смеси овальбумина (100 мкг/свинка) и гидроксида алюминия (5 мг/свинка), разведенных и суспендированных в физиологическом растворе. На 28-е сутки исследования раствор

овальбумина (60 мг/мл) животным вводили интраназально по 20 мкл в каждую ноздрю. На 35-е сутки животным вводили раствор овалбумина (200 мкг/мл, 25 мкл) внутрикожно, предварительно выбрив участок кожи на спине. Подтверждением наличия сенсибилизации было формирование отека и покраснения в месте инъекции. На 42-е сутки исследования проводили интраназальное введение раствора овалбумина (60 мг/мл, 20 мкл/ноздры). С целью контроля формирования именно аллергического воспаления была сформирована группа ложноиммунизированных животных: на 0, 7, 14 и 21 сутки свинки получали раствор гидроксида алюминия (5 мг/свинка), на 28-е и 35-е сутки - физ. раствор, на 42-е овалбумина (60 мг/мл, 20 мкл/ноздры).

Соединения I, III, IV (0.14, 1.4 мг/кг) вводили животным внутривентрикулярно однократно за 3 ч до последнего интраназального введения овалбумина.

В течение 2 ч после последнего введения овалбумина проводили оценку клинических проявлений ринита: подсчитывали количество чихов, почесываний носа.

Результаты исследований представлены в табл. 6-8.

Учет клинических проявлений аллергического ринита в течение 2 ч после последнего интраназального введения овалбумина животным показал выраженное увеличение у экспериментальных животных количества чихов и почесываний носа, что свидетельствует о корректности реализованной модели аллергического ринита.

Таблица 6
Клинические проявления аллергического ринита у морских свинок
при терапии животных соединением I ($M \pm m$, n=10)

| Группа | Количество чихов/2 часа | Количество почесываний носа/2 часа |
|---------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| Ложная иммунизация | 5,9±1,3 | 12,5±3,1 |
| Контроль | 17±1,8* | 69±7,4* |
| Соединение I (0.14 мг/кг) | 9,3±1,7 | 37,3±7,8*& |
| Соединение I (1.4 мг/кг) | 12,1±1,5 | 41,0±12,0 |

Примечания:

* - отличие от интактной группы по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

Таблица 7
Клинические проявления аллергического ринита у морских свинок
при терапии животных соединением III ($M \pm m$, n=10)

| Группа | Количество чихов/2 часа | Количество почесываний носа/2 часа |
|-----------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| Ложная иммунизация | 5,9±0,3 | 10,3±2,2 |
| Контроль | 20,6±0,9* | 75,4±6,5* |
| Соединение III (0.14 мг/кг) | 17,8±0,7*& | 32,5±8,0*& |
| Соединение III (1.4 мг/кг) | 19,0±1,1* | 39,9±9,5*& |

Таблица 8
Клинические проявления аллергического ринита у морских свинок при терапии животных соединением IV ($M \pm m$, $n=10$)

| Группа | Количество чихов/2 часа | Количество почесываний носа/2 часа |
|----------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| Ложная иммунизация | $3,2 \pm 1,06$ | $6,5 \pm 2,33$ |
| Контроль | $15,2 \pm 2,1^*$ | $20,8 \pm 4,2^*$ |
| Соединение IV (0.14 мг/кг) | $1,4 \pm 0,67 \&$ | $5,3 \pm 1,14$ |
| Соединение IV (1.4 мг/кг) | $1,4 \pm 0,6 \&$ | $1,8 \pm 1 \&$ |

Внутрижелудочное введение морским свинкам соединений I, III, IV выражено снижало количество клинических проявлений ринита. Полученные результаты дают основание заключить, что соединения I, III, IV оказывают выраженное терапевтическое действие при аллергическом рините.

Исследование активности соединения I *in vivo* на модели формалин-индуцированного острого риносинусита у крыс

Индукцию острого риносинусита проводили у крыс-самцов Вистар путем интраназального введения 20 мкл 7,5% формалина в каждый носовой ход. Соединение I вводили в дозах 1.8 мг/кг и 18 мг/кг ежедневно один раз в сутки, начиная через 24 ч после введения формалина, последнее введение происходило на 7-е сутки. Дексаметазон (0.6 мг/кг) вводили в том же режиме. На 8-е сутки производили забор назального смыва. В назальном смыве оценивали суммарное количество лейкоцитов и определяли лейкоцитарную формулу.

Анализ назального смыва показал, что острый риносинусит сопровождается выраженным притоком лейкоцитов в полость носа. Максимальное увеличение было отмечено в отношении количества макрофагов (табл. 9).

Внутрижелудочное введение исследуемого соединения крысам снизило содержание макрофагов и нейтрофилов в назальном смыве до уровня интактных животных. По выраженности действия соединение I не уступало дексаметазону (табл. 9).

Таблица 9

Количество клеточных элементов в назальном смыве крыс на модели острого риносинусита ($M \pm m$, $n=10$)

| Группы | Количество клеточных элементов в 1 мкл назального смыва | | | | |
|--------------------------|---|---------------------|-------------|----------------|-----------|
| | Лейкоциты | Нейтрофилы | Эозинофилы | Макрофаги | Лимфоциты |
| Интактные | 3420 ± 641 | 3313 ± 632 | 7 ± 5 | 67 ± 16 | 0 ± 0 |
| Контроль | 5568 ± 1015 | 5217 ± 980 | 16 ± 10 | $291 \pm 72^*$ | 0 ± 0 |
| Соединение I (1.8 мг/кг) | 5410 ± 1143 | 5132 ± 1096 | 11 ± 11 | $231 \pm 49^*$ | 0 ± 0 |
| Соединение I (18 мг/кг) | $2490 \pm 339 \&$ | $2461 \pm 339 \&$ | 0 ± 0 | $28 \pm 7 \&$ | 0 ± 0 |
| Дексаметазон (0.6 мг/кг) | $1735 \pm 451^* \&$ | $1664 \pm 433^* \&$ | 0 ± 0 | $68 \pm 23 \&$ | 0 ± 0 |

Примечания:

* - отличие от интактной группы по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

Таким образом, полученные результаты показали, что соединение I оказывает выраженное терапевтическое действие при риносинусите.

Исследование активности соединения I *in vivo* на модели неинфекционного фарингита у крыс

Модель неинфекционного фарингита реализовали на крысах-самцах линии Вистар. Крысам производили анестезию натрий-тиопентоном (50 мг/кг, внутривенно) и в наружную яремную вену встав-

ляли канюлю с трубкой из силиконового каучука RenaSil® (SIL 037, Braintree Scientific, Inc., Braintree, MA) с помощью гепаринизированного физиологического раствора (40 ЕД/мл). Краситель Эванс голубой (Evans Blue, ЭГ) (30 мг/кг) вводили всем животным внутривенно через катетер; через 10 мин после введения красителя ЭГ на поверхность слизистой глотки наносили 30%-ый раствор формалина следующим образом: язык слегка вытаскивали, область глотки открывали глубоко в полости рта с помощью тупых щипцов и осторожно стерильным ватным тампоном 3 раза наносили раствор формалина (50 мкл) в течение 5 с при каждом нанесении. В интактной группе применяли физиологический раствор.

Через 60 мин после нанесения 30% раствора формалина животных эвтаназируют путем обескровливания. Головную часть каждой крысы перфузируют гепаринизированным физиологическим раствором (40 ЕД/мл), чтобы удалить внутрисосудистый краситель ЭГ.

Степень воспаления оценивали по тесту экссудации красителя Эванса голубого (ЭГ). Краситель ЭГ из ткани экстрагировали в формамид при 55°C в течение 24 ч, и поглощение определяли спектрофотометрически при 620 нм. Количество красителя в ткани рассчитывали, используя стандартную кривую для красителя Эванса голубого, и выражали в микрограммах красителя на грамм сырого веса ткани (мкг/г).

Соединение I вводили внутривенно за 24 и 1 ч до нанесения формальдегида в дозах 6 и 18 мг/кг. Контрольной группе вводили раствор формальдегида с концентрацией 30%. В качестве препаратов сравнения использовали дексаметазон и диклофенак. Дексаметазон (0,6 мг/кг) и диклофенак (8 мг/кг) вводили внутривенно за 24 и 1 ч до нанесения формальдегида. Результаты исследования представлены в табл. 10.

Из табл. 10 видно, что введение формальдегида (контроль) приводит значительному увеличению концентрации красителя в ткани, что говорит о воспалении глотки у крыс - фарингите. Исследуемое соединение проявило значительную защиту от вызываемого формальдегидом фарингита. Соединение I оказало действие во всех тестируемых дозах (6 и 18 мг/кг) - концентрация красителя в ткани снизилась в 2,8 и 6,4 раза, соответственно, по сравнению с контролем. Введение дексаметазона (0,6 мг/кг) также приводило к уменьшению воспаления: концентрация красителя снизилась в 2,1 раза. Диклофенак эффекта не оказал.

Таким образом, полученные результаты показали, что соединение I оказывает выраженное противовоспалительное действие при фарингите.

Таблица 10
Концентрации красителя Эванса голубого в ткани глотки крыс

| Группа | Концентрация красителя в ткани, мкг/мг |
|-----------------------------------|--|
| Интактные | 0,029±0,004 |
| Контроль (формальдегид - 30%) | 0,141±0,015* |
| Соединение I (6 мг/кг) | 0,051±0,016*& |
| Соединение I (18 мг/кг) | 0,022±0,003 & |
| Дексаметазон 0,6 мг/кг | 0,066±0,009*& |
| Диклофенак 8 мг/кг | 0,112±0,031* |

Примечания:

1 - * - различия статистически значимы по сравнению с интактными ($p < 0,05$);

2 - & - различия статистически значимы по сравнению с интактными ($p < 0,05$).

Исследование активности соединения II на модели блеомицин-индуцированного поражения легких. Модель блеомицин-индуцированного поражения легких реализовали по стандартной методике [Am J Respir Cell Mol Biol. 2009 V. 41(1). P. 50-58]. Мышам-самцам линии Balb/c однократно эндотрахеально вводили раствор блеомицина (4 единицы/кг в объеме 50 мкл). Соединение II вводили мышам линии C57BL/6 внутривенно, двукратно - за 1 до введения блеомицина и через 12 ч после введения блеомицина. Через 24ч после введения блеомицина проводили забор бронхоальвеолярного лаважа. В лаваже оценивали суммарное количество лейкоцитов и определяли лейкоцитарную формулу.

Результаты исследования показали, что внутривенное введение соединения II снижает приток клеток воспаления в бронхоальвеолярное пространство (табл. 11). Это дает основание заключить, что соединение II оказывает противовоспалительное действие при поражении легкого.

Таблица 11

Количество клеточных элементов в бронхоальвеолярном лаваже мышей на модели блеомицин-индуцированного острого поражения легких ($M \pm m$, $n=10$)

| Группы | Доза соединения, мг/кг | Количество клеточных элементов в 1 мкл бронхоальвеолярном лаваже | | | | |
|---------------|------------------------|--|----------------|------------|--------------|-----------|
| | | Лейкоциты | Нейтрофилы | Эозинофилы | Макрофаги | Лимфоциты |
| Интактные | - | 151,32±23,85 | 8,51±4,12 | 0,40±0,30 | 122,15±14,69 | 0,00±0,00 |
| Контроль | - | 412,13±65,00* | 212,39±37,00* | 0,00±0,00 | 199,74±34,00 | 0,00±0,00 |
| Соединение II | 3 | 122,34±15,96 & | 82,77±16,87 *& | 0,00±0,00 | 39,57±7,91*& | 0,00±0,00 |
| | 30 | 199,12±46,59 & | 55,21±12,53* & | 0,00±0,00 | 143,90±39,26 | 0,00±0,00 |

Примечания:

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

Исследование активности соединения IV модели липополисахарид-индуцированного острого поражения легких у крыс

Модель липополисахарид-индуцированного острого поражения легких реализовали по стандартной методике [Lin Tong, Jing Bi, Xiaodan Zhu, Guifang Wang, Jie Liu, Linyi Rong, Qin Wang, Nuo Xu, Ming Zhong, Duming Zhu, Yuanlin Song, Chunxue Bai. Keratinocyte growth factor-2 is protective in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats//Respiratory Physiology & Neurobiology. 2014. V. 201. P. 7-14]. Самкам крыс линии Вистар эндотрахеально вводили раствор липополисахарида (ЛПС), приготовленный на физиологическом растворе. Животным группы ложной патологии вводили физиологический раствор в том же объеме. Через 48 ч после введения ЛПС у животных отбирали бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ). Взятие БАЛ проводили под наркозом путем промывания легких 5-ю мл подогретого до 37С физиологического раствора через трахею при помощи шприцевого дозатора.

В жидкости бронхоальвеолярного смыва с помощью камеры Горяева подсчитывали абсолютное количество клеточных элементов в 1 мкл смыва. Затем бронхоальвеолярный лаваж центрифугировали при 200 g в течение 10 мин. Из осадка клеток готовили мазки, которые в дальнейшем фиксировали в метаноле и окрашивали по Романовскому-Гимзе для подсчета цитогаммы.

Соединение IV вводили крысам двукратно, внутривентрикулярно, за 1 ч до введения ЛПС и через 24 ч после введения ЛПС.

Результаты исследования показали, что внутривентрикулярное введение соединения IV снижает приток клеток воспаления в бронхоальвеолярное пространство (табл. 12). Это дает основание заключить, что соединение IV оказывает противовоспалительное действие при поражении легкого.

Таблица 12

Количество клеточных элементов в бронхоальвеолярном лаваже крыс на модели ЛПС-индуцированного острого поражения легких ($M \pm m$, $n=10$)

| Группы | Доза соединения, мг/кг | Количество клеточных элементов в 1 мкл бронхоальвеолярном лаваже | | | | |
|------------------|------------------------|--|------------|------------|-------------|-----------|
| | | Лейкоциты | Нейтрофилы | Эозинофилы | Макрофаги | Лимфоциты |
| Интактные | - | 2263±311 | 199±59 | 0±0 | 2063±265 | 0±0 |
| Ложная патология | | 3434±351 | 825±115 | 0±0 | 2609±302 | 0±0 |
| Контроль | - | 12937±1837,5*# | 3304±597*# | 0±0 | 9633±1502*# | 0±0 |
| Соединение IV | 1.8 | 4485±815*& | 785±181& | 0±0 | 3699±653& | 0±0 |

Примечания:

* - отличие от группы интактных по критерию Краскела-Уоллиса при $p < 0,05$

- отличие от группы ложной патологии по критерию Краскела-Уоллиса при $p < 0,05$

& - отличие от группы контроля по критерию Краскела- Уоллиса при $p < 0,05$

Исследование активности соединения II, соединения IV, соединения VI, соединения I на модели лихорадочной реакции у крыс

Модель лихорадочной реакции реализовали по стандартной методике [J Neurosci Methods. 2005. V. 147. P. 29-35]. Крысам линии Wistar подкожно вводили 2 0% суспензии пекарских дрожжей (12 мл/кг). Соединения I, II, IV, VI, VIII вводили однократно, внутривенно, через 14 ч после введения дрожжей. Ректальную температуру измеряли электротермометром до введения пирогена и на самой высокой точке развития термической реакции - через 19 ч после него. Антипирогенное действие соединений исследовалось в 2-7 экспериментах.

Результаты исследования показали, что внутривенное введение исследуемых соединений снизило прирост ректальной температуры тела крыс (табл. 13-17). Полученные данные позволяют заключить, что соединения I, II, IV, VI, VIII оказывают антипирогенное действие.

Таблица 13

Прирост ректальной температуры тела через 19 ч после подкожного введения дрожжей крысам, °C
($M \pm m$, n=30-90)

| Группа | Доза соединения, мг/кг | Количество животных в группе | Прирост ректальной температуры тела, °C |
|---------------|------------------------|------------------------------|---|
| Интактные | - | 70 | 0,05±0,05 |
| Контроль | - | 90 | 1,70±0,06* |
| Соединение II | 0.18 | 40 | 1,18±0,08*& |
| | 0.6 | 30 | 0,78±0,07*& |
| | 1.8 | 70 | 1,09±0,06*& |

Примечания:

* - отличие от группы интактных по критерию Краскела-Уоллиса при $p < 0,05$

& - отличие от группы контроля по критерию Краскела-Уоллиса при $p < 0,05$

Таблица 14

Прирост ректальной температуры тела через 19 ч после подкожного введения дрожжей крысам, °C
($M \pm m$, n=30-90)

| Группа | Доза соединения, мг/кг | Количество животных в группе | Прирост ректальной температуры тела, °C |
|---------------|------------------------|------------------------------|---|
| Интактные | - | 70 | 0,30±0,10 |
| Контроль | - | 90 | 1,90±0,10* |
| Соединение VI | 0.018 | 40 | 0,90±0,10*& |
| | 0.18 | 30 | 1,00±0,20*& |

Примечания:

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

Таблица 15

Прирост ректальной температуры тела через 19 ч после подкожного введения дрожжей крысам, °С
($M \pm m$, n=40-70)

| Группа | Доза соединения, мг/кг | Количество животных в группе | Прирост ректальной температуры тела, °С |
|--------------|------------------------|------------------------------|---|
| Интактные | - | 50 | 0,01±0,08 |
| Контроль | - | 70 | 1,70±0,07* |
| Соединение I | 0.018 | 40 | 1,01±0,09* & |
| | 0.06 | 40 | 0,88±0,11* & |
| | 0.18 | 50 | 1,01±0,08* & |
| | 0.6 | 40 | 0,88±0,11* & |
| | 1.8 | 50 | 1,14±0,09* & |

Примечания:

* - отличие от группы интактных по критерию Краскела-Уоллиса при $p < 0,05$

& - отличие от группы контроля по критерию Краскела-Уоллиса при $p < 0,05$

Таблица 16

Прирост ректальной температуры тела через 19 ч после подкожного введения дрожжей крысам, °С
($M \pm m$, n=40-70)

| Группа | Доза соединения, мг/кг | Количество животных в группе | Прирост ректальной температуры тела, °С |
|---------------|------------------------|------------------------------|---|
| Интактные | - | 50 | 0,03±0,07 |
| Контроль | - | 70 | 1,75±0,07* |
| Соединение IV | 0.018 | 40 | 1,18±0,08*& |
| | 0.06 | 40 | 1,28±0,07*& |
| | 0.18 | 50 | 1,36±0,05* |
| | 0.6 | 40 | 1,27±0,09*& |

Примечания:

* - отличие от группы интактных по критерию Краскела-Уоллиса при $p < 0,05$

& - отличие от группы контроля по критерию Краскела-Уоллиса при $p < 0,05$

Таблица 17

Прирост ректальной температуры тела через 19 ч после подкожного введения дрожжей крысам, °С
($M \pm m$, n=40-70)

| Группа | Доза соединения, мг/кг | Количество животных в группе | Прирост ректальной температуры тела, °С |
|---------------|------------------------|------------------------------|---|
| Интakтные | - | 10 | 0,32±0,21 |
| Контроль | - | 10 | 1,83±0,11* |
| Соединение IV | 1.8 | 10 | 1,16±0,12* & |

Примечания:

* - отличие от группы интактных по критерию Краскела-Уоллиса при $p < 0,05$

& - отличие от группы контроля по критерию Краскела-Уоллиса при $p < 0,05$

Исследование активности соединения I и соединения IV на модели специфической болевой реакции методом химического раздражения брюшины (тест "уксусные корчи")

Модель специфической болевой реакции методом химического раздражения брюшины (тест "уксусные корчи") реализовали по стандартной методике. Для проведения теста "уксусные корчи" мышам линии Balb/c интраперитонеально вводили 1% уксусную кислоту в объеме 10 мл на 1 кг массы животного. Соединения I, IV, VII, IX, X вводили внутривентрикулярно, однократно, за 1 ч до введения уксусной кислоты. Оценивали количество корчей (судорожные сокращения брюшных мышц, сопровождающихся вытягиванием задних конечностей и прогибанием спины) за 15 мин после введения уксусной кислоты.

Результаты исследования показали, что внутривентрикулярное введение соединений I, IV, VII, IX, X выражено снижает количество корчей у мышей, вызванных внутрибрюшинным введением уксусной

кислоты (табл. 18-19). Полученные результаты позволяют заключить, что соединения I, IV, VII, IX, X оказывают выраженное терапевтическое действие при болевом синдроме.

Таблица 18

Количество укусных корчей на модели специфической болевой реакции методом химического раздражения брюшины (тест "укусные корчи") ($M \pm m$, $n=10-31$)

| Группа | Доза соединения, мг/кг | Количество животных в группе | Количество корчей за 15 минут |
|---------------|------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Контроль | | 31 | 34,68 \pm 2,40 |
| Соединение I | 0.03 | 10 | 22,70 \pm 2,14* |
| | 0.3 | 20 | 13,90 \pm 2,23* |
| | 3 | 20 | 18,65 \pm 2,44* |
| | 30 | 20 | 21,15 \pm 2,97* |
| Соединение IV | 0.03 | 10 | 23,60 \pm 2,54* |
| | 0.3 | 10 | 15,50 \pm 2,63* |
| | 3 | 10 | 19,20 \pm 3,43* |
| | 30 | 10 | 15,30 \pm 3,10* |
| Кеторол | 15 | 20 | 23,60 \pm 1,87* |

Примечания:

* - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Таблица 19

Количество укусных корчей на модели специфической болевой реакции методом химического раздражения брюшины (тест "укусные корчи") ($M \pm m$, $n=10-31$)

| Группа | Доза соединения, мг/кг | Количество животных в группе | Количество корчей за 15 минут |
|----------------|------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Контроль | | 10 | 48 \pm 5,71 |
| Соединение VII | 0.3 | 10 | 17,6 \pm 2,81* |
| Соединение IX | 0.3 | 10 | 11,6 \pm 3,5* |
| Соединение X | 0.3 | 10 | 17,2 \pm 3,4* |

Примечания:

* - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Исследование активности соединения I и соединения II на модели термического болевого раздражения "горячая пластина"

Модель термического болевого раздражения "горячая пластина" реализовали по стандартной методике [Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. Neuroscience. 2012 Jun 1; 211:39-50.]. Соединение I и соединение II вводили мышам линии Balb/c внутривенно, однократно. Через 1 ч после введения препарата проводили тест "горячая пластина". Для проведения теста "горячая пластина" мышей помещали на горячую пластину, температура ($+55 \pm 1^\circ\text{C}$) которой постоянна. Регистрировали время первых проявлений болевой реакции у мышей (облизывание лап, подпрыгивание) и вычисляли среднее латентное время порога болевой чувствительности (ПБЧ, сек) в каждой группе.

Результаты исследования показали, что внутривенное введение исследуемых соединений в 1,5 раза увеличило порог болевой чувствительности мышей при проведении теста "горячая пластина" (табл. 20). Полученные данные позволяют заключить, что соединение I и соединение II оказывают выраженный анальгетический эффект при болевом синдроме.

Таблица 20

Порог болевой чувствительности (ПБЧ) на модели термического болевого раздражения "горячая пластина", % к значениям до введения препарата ($M \pm m$, $n=20$)

| Группа | Доза соединения, мг/кг | Через 1 час, % к фону |
|---------------|---------------------------|--------------------------|
| Контроль | | 72,51±5,80 |
| Соединение I | 0.3 | 101,13±9,64* |
| | 3 | 95,28±6,79* |
| | 30 | 104,55±8,52* |
| Соединение II | 0.3 | 97,43±6,43* |
| | 3 | 90,54±6,59* |
| | 30 | 110,18±11,9* |

Примечания:

* - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Исследование активности соединения II на модели спонтанного ожирения у мышей линии db/db

Для моделирования спонтанного ожирения использовали мышей линии db/db, которые несут рецессивный ген leptin receptor-Leprdb-(db) (8-я группа сцепления, 4-я хромосома) [Cardiovasc. Diabetol. 2012. V.11. P. 139-147; Biochem. Biophys. Res. Commun. 2016. V. 472. P. 603-609].

Соединение II вводили внутривентрикулярно, начиная с 7 недели жизни животных. Ежедневно на 6-12 неделях жизни животных измеряли массу тела животных.

Результаты исследования показали, что на модели ожирения внутривентрикулярное введение соединения II в дозе 7.5 мг/кг мышам снижает прирост массы тела db/db-мышей (табл. 21).

Полученные результаты говорят о терапевтическом действии соединения II при ожирении. Терапевтический эффект начинается уже на 4 неделе применения соединения II.

Исследование активности соединения II на модели метаболического синдрома

Модель метаболического синдрома реализовали путем содержания крыс-самцов линии Wistar в течение 16 недель на высокожировой диете ("диета кафетерия") в соответствии со стандартной методикой [Rothwell N.J., Stock M.J., Warwick B.P. Energy balance and brown fat activity in rats fed cafeteria diets or high-fat, semisynthetic diets at several levels of intake//Metabolism. 1985. Vol. 34(5). P. 474-480].

С 10-й по 16-ю недели диеты животным опытных групп внутривентрикулярно один раз в сутки вводили соединение II. Оценку активности исследуемого соединения проводили с помощью еженедельного измерения массы тела.

Результаты исследования показали, что внутривентрикулярное введение соединения II снижает прирост массы тела животных.

Фармакологическое действие начинает проявляться, начиная с 5-й недели терапии (табл. 22).

Таким образом, на модели метаболического синдрома соединение II снижает ожирение животных.

Таблица 21

Прирост массы тела животных относительно начала введения соединения II на модели спонтанного ожирения у мышей линии db/db ($M \pm m$)

| Группы | Доза соединения, мг/кг | Возраст животных к моменту снятия показателей, недели | | | | | | |
|------------------|---------------------------|---|------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|
| | | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| | | Недели введения Соединения 1 | | | | | | |
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Интактные (db/m) | | 100,0±4,4 | 100,0±0,9 | 103,3±0,9 | 106,0±0,9 | 109,8±1,5 | 113,3±1,1 | 116,5±1,5 |
| Контроль (db/db) | | 100,0±2,9 | 109,6±3,1* | 118,3±3,3* | 126,2±3,3* | 131,0±3,4* | 134,2±4,2* | 139,2±4,8* |
| Соединение II | 0.75 | 100,0±1,7 | 108,5±1,5* | 119,6±3,7* | 123,9±3,8* | 126,5±4,0* | 127,3±4,2* | 129,8±5,2* |
| | 7.5 | 100,0±2,3 | 111,4±2,9* | 119,9±2,6* | 122,1±2,5* | 121,7±2,5*& | 121,7±3,1*& | 109,4±4,4& |

Примечания:

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

Таблица 22
 Масса тела крыс на модели метаболического синдрома ($M \pm m$, $n=12$)

| Недели исследования | Недели терапии | Интактные | Контроль | Соединение II (1.5 мг/кг) |
|---------------------|----------------|---------------|----------------|---------------------------|
| 0 | - | 245,50±5,30 | 250,17±3,95 | 239,67±3,27 |
| 1 | - | 259,08±5,80 | 312,83±8,84*# | 292,08±4,70* # |
| 2 | - | 276,42±6,20# | 325,33±7,60*# | 307,33±5,53* # |
| 3 | - | 305,00±7,30# | 345,08±9,84*# | 327,25±7,81* # |
| 4 | - | 327,92±6,50# | 374,75±11,28*# | 355,50±9,05* # |
| 5 | - | 348,00±5,70# | 409,25±12,37*# | 379,42±7,41* # |
| 6 | - | 354,83±5,60# | 471,33±12,88*# | 443,00±7,70* # |
| 7 | - | 321,00±5,60# | 498,25±13,08*# | 469,08±6,38* # |
| 8 | - | 341,08±5,60# | 520,83±13,77*# | 491,83±6,04* # |
| 9 | - | 359,17±6,00# | 546,50±14,78*# | 518,25±6,04* # |
| 10 | 1 | 374,17±6,60# | 559,08±16,87*# | 528,08±6,01* # |
| 11 | 2 | 394,75±6,80# | 571,92±18,62*# | 547,92±8,27* # |
| 12 | 3 | 393,33±7,90# | 579,50±18,66*# | 551,00±8,36* # |
| 13 | 4 | 394,17±8,50# | 592,58±18,47*# | 553,58±8,52* # |
| 14 | 5 | 396,83±10,20# | 613,17±18,86*# | 563,67±9,75*#& |
| 15 | 6 | 398,42±9,50# | 631,50±18,94*# | 570,75±9,13*#& |
| 16 | 7 | 397,42±8,30# | 627,17±18,72*# | 572,08±8,23*#& |

Примечания:

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

- отличие от значений на 0 неделе исследования по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

Исследование активности соединения I и соединения II на модели псориаза у мышей

Индукцию псориаза у мышей осуществляли по стандартной методике [European Journal of Pharmacology. 2015. V. 756. P. 43-51]. Мышам-самкам линии Balb/c наносили крем Алдара (5% имиквимод) на внутреннюю сторону правого уха 1 раз в сутки по 30 мг/мышь в течение 7 дней (0-6 сутки). Интактным животным наносили вазелин. Соединение I, соединение II и препарат сравнения (циклоsporин) вводили животным внутривентрикулярно, ежедневно, 1 раз в сутки в течение 6 дней (0-5е сутки). Эвтаназию проводили через 24 ч (6-е сутки) после последнего нанесения крема Альдара. Ежедневно на 0, 2, 3, 4, 5-е сутки утром перед очередным нанесением крема Алдара и перед эвтаназией измеряли толщину правого уха.

Оценку выраженности псориаза проводили по измерению прироста толщины пораженного уха в динамике.

Результаты исследования представлены в табл. 23.

Таблица 23

Прирост толщины пораженного уха в определенный день исследования к 0 дню на модели псориаза у мышей, % ($M \pm m$, $n=10$)

| Группа | Доза соединения, мг/кг | Прирост толщины уха в определенный день исследования к 0 дню, % | | | |
|---------------|------------------------|---|-------------|-------------|-------------|
| | | 3 сутки | 4 сутки | 5 сутки | 6 сутки |
| Интактные | - | 4,86±0,9 | 7,8±0,98 | 9,81±1,83 | 14,8±1,3 |
| Контроль | - | 40,3±5,3* | 67,7±7,9* | 82,6±9,5* | 101±9,8* |
| Соединение I | 0.3 | 38,3±5,8* | 45,2±4,1*#& | 57,3±3,9*#& | 62,8±5,4*#& |
| Соединение II | 0.3 | 35,3±2,1* | 48,1±2,8*#& | 59,6±4,5*#& | 70,6±4,4*#& |

Примечания:
 * - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$
 & - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

Результаты исследования показали, что внутривентрикулярное введение соединения I и соединения II на модели псориаза у мышей снижает прирост толщины пораженного уха животных. Это свидетельствует

ет о терапевтическом действии соединений I и II при псориазе.

Таким образом, на модели псориаза у мышей соединения I и II оказывают выраженный терапевтический эффект.

Исследование активности соединения I и соединения II на модели атопического дерматита у мышей

Модель атопического дерматита реализовали по стандартной методике [J Ginseng Res. 2011. Vol.4. - P. 479-86]. Атопический дерматит моделировали на мышках-самцах линии balb/c. В качестве индуктора контактного дерматита использовали 1-хлор-2,4-динитробензол (ДНХБ). На 0 и 12 сутки эксперимента животным на предварительно выбритые участки спины наносили 100 мкл 2% раствора ДНХБ с целью сенсибилизации организма. На 17 сутки на правое "опытное" ухо животным наносили 20 мкл 2% спиртового раствора ДНХБ дважды с интервалом 1 ч. Интактным животным вместо раствора ДНХБ наносили этанол. Животных в группе ложной иммунизации сенсибилизировали этанолом. Соединение I и соединение II вводили внутривенно один раз в сутки с 8 по 17 сутки. На 18 сутки проводили забор животных. Для оценки степени отека после эвтаназии определяли массу "опытного" и "контрольного" уха. Вычисляли индекс реакции (ИР), выраженный в процентах разницы в массах "опытного" и "контрольного" уха.

Результаты исследования представлены в табл. 24.

Таблица 24

Разница массы "опытного" и "контрольного" уха мышей и индекс реакции на модели атопического дерматита у мышей (M±m, n=12)

| Название группы | Разница массы "опытного" и "контрольного" уха (мг) | Индекс реакции (%) |
|--------------------------------|--|--------------------|
| Интактная | -0,001±0,002 | -0,82±5,3 |
| Ложная иммунизация | 0,018±0,003* | 57,8±11,3* |
| Контроль патологии | 0,029±0,002*# | 83,3±6,1* |
| Соединение I (3 мг/кг) | 0,007±0,003 #& | 25,4±10,2*#& |
| Соединение II (3 мг/кг) | 0,013±0,002* & | 38,1±7,7* & |

Примечания:

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при p<0,05

- отличие от группы ложной иммунизации по t-критерию Стьюдента при p<0,05

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при p<0,05

Результаты исследования показали, что внутривенное введение соединения I и соединения II на модели атопического дерматита у мышей снижает индекс реакции патологического процесса. Это свидетельствует о терапевтическом действии соединений I и II при атопическом дерматите.

Таким образом, на модели атопического дерматита у мышей соединения I и II оказывают выраженный терапевтический эффект.

Исследование влияния соединения II на хемотаксис макрофагов in vivo на модели каррагенинового мешочка

Для оценки эффективности действия лекарственного препарата на активность клеток иммунной системы на доклиническом этапе исследований как правило используются различные модели острого воспалительного процесса. На сегодняшний день наиболее часто используют модели, в которых патологический процесс развивается в ограниченной полости. Данные модели позволяют достаточно близко симулировать заболевания при котором аберрантная активностью клеток иммунной системы локализуется в определенной полости (перитонит, холангит, артрит) (J Pharmacol Toxicol Methods. 1994 Nov; 32(3):139-47). Модель каррагенинового мешочка часто используется на доклиническом этапе исследований для исследования патологических процессов, связанных с аберрантной активностью клеток иммунной системы, локализованной в изолированной полости. В этой модели, изолированный мешочек формируется подкожной инъекцией воздуха во внутрикапсульную область спины мыши или крысы. Подкожная инъекция воздуха в область спины, за несколько дней приводит к морфологическим изменениям в клеточной выстилке мешочка. Мешочек состоит главным образом из макрофагов и фибробластов и хорошо васкуляризован. На шестой день от момента формирования воздушного мешочка в полость воздушного мешочка вводят раствор λ-каррагенина. Каррагенин взаимодействует с рецепторами TLR4 на поверхности макрофагов, выстилающих внутрикапсульную область мешочка, что вызывает их активацию и последующий синтез хемокинов и других медиаторов (IL-1; IL-6; TNFα, IL-8, простагландинов и лейкотриенов, NO) и так же к миграцию клеток иммунной системы внутрь мешочка.

Исследование активности соединения II выполняли на мышках-самцах линии Balb/c по стандартной

методике (Curt Protoc Pharmacol. 2012 Mar; Chapter 5:Unit5.6). Опытным группам животным внутрижелудочно вводили соединение II в дозе 3 мг/кг сразу перед введением каррагинина и затем каждые 10-12 ч. Последнее введение - за 12 ч до забоя.

Спустя 48 ч после инъекции λ -каррагинина отдельные группы животных подвергались эвтаназии ингаляцией CO₂. Сразу же после эвтаназирования внутрь мешочка стерильным шприцом 25G вводили 1 мл физиологического раствора, содержащего 5,4 mM EDTA, комнатной температуры. После легкого массажа области воздушного мешочка делали сагитальный разрез поперек мешочка и дозатором собирали экссудат в стерильные пробирки объемом 15 мл. В экссудате с помощью камеры Горяева определяли абсолютное количество клеточных элементов на 1 мкл смыва (цитоз). Затем экссудат центрифугировали при 200 g в течение 10 мин. Из осадка клеток готовили мазки, которые в дальнейшем фиксировали в метаноле (5 мин) и окрашивали по Романовскому-Гимзе (40 мин при t 20-22°C). На мазках рутинным способом под микроскопом Olympus bx51 (на увеличении 100) подсчитывали количество макрофагов. Подсчет клеток производили до 100 шт.

Проведенные исследования показали, что применение соединения II в 10 раз снизило приток лейкоцитов и макрофагов (до уровня интактного контроля) (табл. 25). Таким образом, соединение II может иметь потенциал для терапии широкого круга заболеваний, таких как болезнь Крона, язвенный колит, перитониты и артриты.

Таблица 25

Количество клеток иммунной системы в экссудате из каррагининового мешочка при исследовании активности соединения II на модели хемотаксиса макрофагов (каррагининовый мешочек), $\times 10^9/\text{л}$ (M \pm m, n=10)

| Группы | Количество клеточных элементов в 1мкл экссудата, $\times 10^9/\text{л}$ | |
|--------------------------------|---|-----------------|
| | Лейкоциты | Макрофаги |
| Интактные | 0,9 \pm 0,2 | 0,6 \pm 0,1 |
| Контроль | 9,9 \pm 1,5* | 7,7 \pm 1,5* |
| Соединение II (3 мг/кг) | 1,0 \pm 0,1 & | 0,5 \pm 0,1 & |

* - различия статистически значимы по сравнению с интактными (p<0,05)

& - различия статистически значимы по сравнению с контрольными (p<0,05)

Исследование влияния соединения II на хемотаксис макрофагов in vivo на модели тиогликолятного перитонита

Исследование выполнено на мышах-самцах линии balb/c по стандартной методике (J Leukoc Biol. 2009 Aug; 86(2):361-70). Мышам контрольной группы внутрибрюшинно вводили 2 мл 3% тиогликолевой среды, хранившейся в течение 1 месяца. Интактным животным внутрибрюшинно вводили 2 мл физиологического раствора. Опытным группам животным внутрижелудочно вводили соединения II за 1ч до введения тиогликолята, 24 и 48 ч после введения тиогликолята в дозе 1 мг/кг. Через 72 ч животных эвтаназировали в CO₂-камере, область брюшины смачивали 70% спиртом, аккуратно срезали кожу на брюшной полости, шприцом внутрибрюшинно вводили 5 мл холодного фосфатно-солевого буфера, содержащего 0.1% ЭДТА. После легкого массажа брюшной полости экссудат собирали шприцом в пробирки, определяли объем собранного экссудата. В экссудате с помощью камеры Горяева определяли абсолютное количество клеточных элементов на 1 мкл смыва (цитоз). Затем экссудат центрифугировали при 200 g в течение 10 мин. Из осадка клеток готовили мазки, которые в дальнейшем фиксировали в метаноле (5 мин) и окрашивали по Романовскому-Гимзе (40 мин при t 20-22°C). На мазках рутинным способом под микроскопом Olympus bx51 (на увеличении 100) подсчитывали количество моноцитов/макрофагов. Подсчет клеток производили до 100 шт.

Проведенные исследования показали, что применение соединения II снижает приток макрофагов в перитонеальную полость крыс, индуцированной 3% тиогликолиевой средой и снижает тяжесть патологии индуцированной введением тиогликолиевой средой (табл. 26). Таким образом, соединение II может иметь потенциал для терапии перитонитов, болезни Крона и язвенного колита.

Таблица 26

Количество клеток иммунной системы в экссудате из брюшной полости при исследовании активности соединения II на модели хемотаксиса макрофагов (тиогликолятный перитонит), $\times 10^9/\text{л}$ ($M \pm m$, $n=10$)

| Группы | Количество клеточных элементов в 1мкл экссудата, $\times 10^9/\text{л}$ | |
|-------------------------|---|------------------|
| | Лейкоциты | Моноциты |
| Интактные | 0,71 \pm 0,09 | 0,61 \pm 0,07 |
| Контроль | 3,99 \pm 0,42* | 3,66 \pm 0,44* |
| Соединение II (1 мг/кг) | 1,97 \pm 0,36*& | 0,65 \pm 0,12& |

* - различия статистически значимы по сравнению с интактными ($p < 0,05$)

& - различия статистически значимы по сравнению с контрольными ($p < 0,05$)

Исследование активности соединения II и соединения I на модели адьювантного артрита, индуцированного введением полного адьюванта Фрейнда

Модель адьювантного артрита реализовали на беспородных крысах-самцах по стандартной методике [Chem Pharm Bull (Tokyo). 2018. V.66(4). P.410-415]. На 0 и 5 сутки в правую заднюю конечность животных субплантарно вводили полный адьювант Фрейнда (Freund's Adjuvant, Complete (Pierce)) в объеме 100 мкл на животное. Объем правой задней лапы (пораженной) и левой задней лапы (контрлатеральной) измеряли на 0, 14, 16, 18, 21, 25, 28 и 30 сутки с помощью плетизмометра (Ugo Basel). По изменению объема пораженной лапы судили о первичной (воспалительной) реакции, по изменению объема контрлатеральной лапы судили о вторичной (иммунной) реакции. Соединение II вводили внутривенно, ежедневно, 1 раз в сутки, с 14 по 30е сутки исследования.

Результаты исследования представлены в табл. 27-28. Проведенное исследование показало, что применение соединения II снижает прирост объема, как пораженной лапы, так и контрлатеральной лапы. Это позволяет заключить о наличии у соединения II как противовоспалительного действия, так и иммуноотропного действия. Таким образом, соединение II имеет высокий терапевтический потенциал для лечения ревматоидного артрита и других видов артритов, а также артрозов.

Таблица 27

Прирост объема пораженной лапы на модели адьювантного артрита, индуцированного введением полного адьюванта Фрейнда, % ($M \pm m$, $n=10$)

| Группа | Доза соединения, мг/кг | Прирост объема пораженной лапы, % к исходному уровню | | | | | | |
|---------------|------------------------|--|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | 14 сутки | 16 сутки | 18 сутки | 21 сутки | 25 сутки | 28 сутки | 30 сутки |
| Интактные | | 1,8 \pm 0,8 | 1,9 \pm 0,7 | 1,4 \pm 0,3 | 1,9 \pm 0,4 | 2,2 \pm 0,2 | 2,7 \pm 0,2 | 3 \pm 0,2 |
| Контроль | | 122,3 \pm 6,4* | 118,7 \pm 5,6* | 114,3 \pm 2,1* | 98,9 \pm 3,2* | 100,6 \pm 2,6* | 102,5 \pm 1,8* | 101,4 \pm 2,8* |
| Соединение II | 0.5 | 118,8 \pm 3,6* | 105 \pm 3,2* | 104,4 \pm 2,7*& | 86,3 \pm 3,9*& | 88,5 \pm 2,4*& | 86,9 \pm 2,3*& | 83,2 \pm 2,2*& |

Примечание:

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Таблица 28

Прирост объема контрлатеральной лапы на модели адьювантного артрита, индуцированного введением полного адьюванта Фрейнда, % ($M \pm m$, $n=10$)

| Группа | Доза соединения, мг/кг | Прирост объема контрлатеральной лапы, % к исходному уровню | | | | | | |
|---------------|------------------------|--|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | 14 сутки | 16 сутки | 18 сутки | 21 сутки | 25 сутки | 28 сутки | 30 сутки |
| Интактные | | 1,27 \pm 0,3 | 1,59 \pm 0,48 | 1,77 \pm 0,25 | 1,62 \pm 0,31 | 2,18 \pm 0,3 | 2,76 \pm 0,16 | 2,98 \pm 0,3 |
| Контроль | | 5,48 \pm 0,58* | 7,08 \pm 1,24* | 21,69 \pm 1,28* | 25,29 \pm 1,69* | 20,16 \pm 1,66* | 18,75 \pm 1,13* | 17,51 \pm 1,59* |
| Соединение II | 0.5 | 5,39 \pm 1,67* | 6,75 \pm 1,58* | 18,48 \pm 1* | 19,77 \pm 1,67*& | 15,45 \pm 1,21*& | 14,04 \pm 1,75*& | 13,02 \pm 0,94*& |

Примечание:

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Исследование активности соединения II на модели каррагенинового отека

Для оценки влияния соединения II на функциональный статус иммунной была использована модель каррагенин-индуцированного отека лапы крыс. Эксперименты выполнены на белых нелинейных крысах самцах массой 250-270 г. Острое воспаление лапы у крыс вызывали интраплантарным введением (подкожно) в объеме 0,1 мл в правую лапу 1.5% раствора каррагенина. Исследуемое соединение вводили внутривенно за 1 ч до введения каррагенина. Действие соединения II и контрольного вещества (диклофенак) оценивали по степени снижения отека лапы в сравнении с интактной левой лапой. Объем лапы оценивали до введения соединения II и через 2 ч после введения каррагенина.

Результаты исследования представлены в табл. 29.

Таблица 29

Влияние соединения II на торможение прироста отека лапы крыс (относительно контроля) в модели каррагенин-индуцированного отека.

| Группа | Индукция патологии | Введение препаратов | Сроки проведения оценки | Торможение прироста отека, % |
|-----------------------------|--|---|--------------------------------------|------------------------------|
| Интактные | Интраплантарное введение в объеме 0,1 мл в правую лапу 1.5% раствора каррагенина | Внутрижелудочно, однократно, за 1 ч до введения каррагенина | через 2 ч после введения каррагенина | 0 |
| Контроль | | | | 0 |
| Соединение II (1.8 мг/кг) | | | | 34 |
| Соединение II (0.18 мг/кг) | | | | 34 |
| Диклофенак натрия (8 мг/кг) | | | | 42 |

Из приведенных результатов видно, что соединение II обладает прямым тормозящим действием на прирост отека лапы и может быть использовано для лечения широкого круга заболеваний, связанных с активностью клеток иммунной системы.

Изучение активности соединения II в модели диабетической нефропатии у крыс

Модель диабетической нефропатии у крыс индуцировали длительным содержанием животных на рационе высокожировой диеты и однократным или двукратным внутривенным введением стрептозотоцина в дозе 30 мг/кг (Int J Clin Exp Med. 2015 Apr 15; 8(4):6388-96).

Животных содержали на высокожировой диете в течение 16 недель, на 9-ой неделе крысам внутривенно вводили стрептозотоцин двукратно (2 дня подряд) в дозе 30 мг/кг. Через 7 дней после введения стрептозотоцина начинали введение соединения II. Субстанцию вводили ежедневно внутривенно один раз в день в дозе 50 мг/кг.

Внутрижелудочное введение соединения II начиная с 10 недели исследования снизило суточное содержание белка в моче экспериментальных животных до уровня интактного контроля (табл. 30). Полученные результаты позволяют заключить, что соединение II оказывает терапевтическое действие при диабетической нефропатии.

Таблица 30

Биохимический анализ мочи после 6 недели внутривенного введения соединения II крысам в модели диабетической нефропатии, индуцированной высокожировой диетой и введением стрептозотоцина (15 недель высокожировой диеты)

| Группы | Доза и режим введения стрептозотоцина | Кол-во животных | Диурез, мл/18 ч. | Суточный белок, мкг/18ч | ACR (белок (мкг/л) / креатинин (мг/л)) |
|-----------|---------------------------------------|-----------------|------------------|-------------------------|--|
| Интактные | - | 8 | 4,35±0,5 | 1041,2±153,5 | 273,2±68,0 |
| Контроль | 30 мг/кг, двукратно | 14 | 8,32±1,5 | 3718,2±572,7* | 952,8±186,4* |

| Соединение | | | | | |
|--------------|---------------------|----|----------|--------------------|--------------|
| II (5 мг/кг) | 30 мг/кг, двукратно | 12 | 7,45±1,0 | 1846,3±337,6 *& | 202,3±26,8 & |

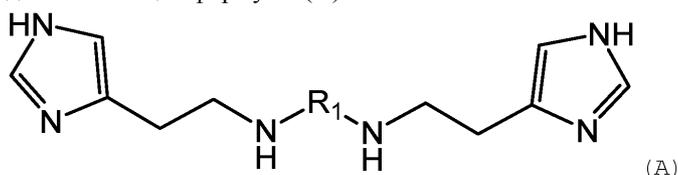
* - различия статистически значимы по сравнению с интактными ($p < 0,05$)

& - различия статистически значимы по сравнению с контрольными ($p < 0,05$)

Несмотря на то, что изобретение описано со ссылкой на раскрываемые варианты воплощения, для специалистов в данной области должно быть очевидно, что конкретные подробно описанные эксперименты приведены лишь в целях иллюстрирования настоящего изобретения, и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения. Должно быть понятно, что возможно осуществление различных модификаций без отступления от сути настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение соединений общей формулы (A):



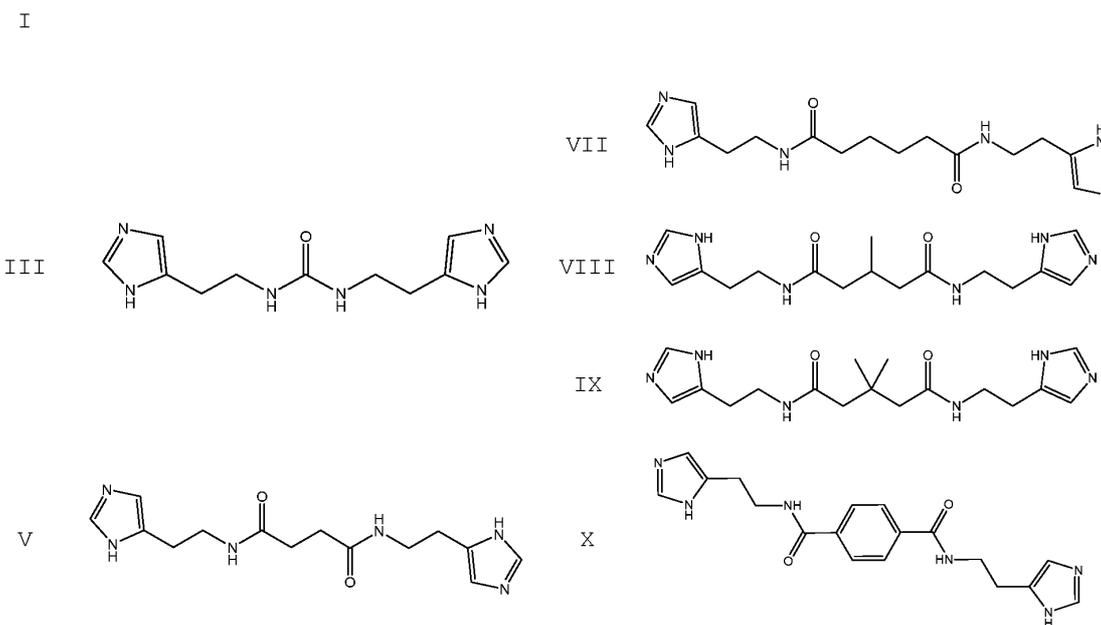
в которой

R_1 представляет собой группу $-C(O)-R_2-C(O)-$ или $-R_2-C(O)-$, где

R_2 представляет собой группу $-(CH_2)_n-$, необязательно замещенную одним или двумя C_1-C_6 алкилами, или фенил,

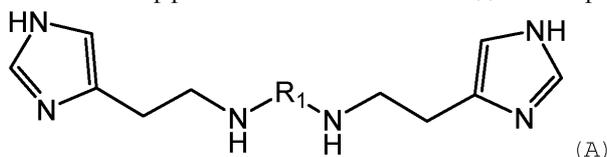
n представляет собой целое число от 0 до 4;

причем соединения выбраны из группы, состоящей из соединений формулы



или их фармацевтически приемлемых солей, гидратов или сольватов для лечения заболеваний легких и дыхательных путей, где заболевание выбрано из группы, включающей болевой синдром, бронхиальную астму, острый или хронический бронхит, фарингит, эмфизему легкого, ринит, риносинусит, хроническую обструктивную болезнь легких и острое повреждение легких, лихорадку.

2. Способ лечения заболевания легких и дыхательных путей, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества соединения формулы (A)



в которой

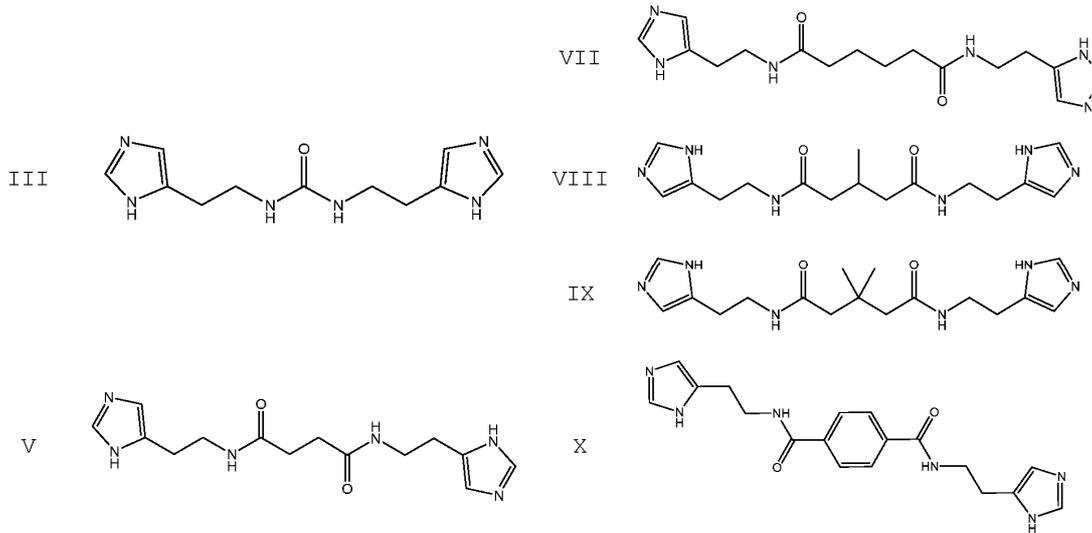
R_1 представляет собой группу $-C(O)-R_2-C(O)-$ или $-R_2-C(O)-$, где

R_2 представляет собой группу $-(CH_2)_n-$, необязательно замещенную одним или двумя C_1-C_6 алкилами,

ми, или фенил,

n представляет собой целое число от 0 до 4;

причем соединения выбраны из группы, состоящей из следующих соединений:



или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата или сольвата, где заболевание выбрано из группы, включающей болевой синдром, бронхиальную астму, острый или хронический бронхит, фарингит, эмфизему легкого, ринит, риносинусит, хроническую обструктивную болезнь легких и острое повреждение легких, лихорадку.

