

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391591 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.09.19

(22) Дата подачи заявки
2021.11.18

(51) Int. Cl. *A61K 31/167* (2006.01)
A61K 31/27 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
A61K 47/06 (2006.01)

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ПРОИЗВОДНЫХ НАФТАЛИНА В КАЧЕСТВЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ НЕСКОЛЬКИХ МИШЕНЕЙ, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА**

(31) 2020-0087

(32) 2020.11.24

(33) CU

(86) PCT/CU2021/050012

(87) WO 2022/111742 2022.06.02

(71) Заявитель:

СЕНТРО ДЕ НЕУРОСЬЕНСИАС ДЕ
КУБА (CU)

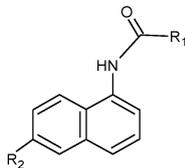
(72) Изобретатель:

Родригес-Танти Крислаин, Саблон
Каррасана Маркиза, Менендес
Сото Дель Валле Роберто, Бенкомо
Мартинес Альберто, Ривера Марреро
Сучитиль, Гарсия Пуно Лаура,
Гонсалес Меса Леонора, Леон
Кавиано Самила, Агила Кордова
Адриана, Каситро-Паломина Антела
Катлин, Пентон Роль Жизель, Отаньо
Тамайо Лаура, Перес Перера Рафаэла,
Сервантес Льянос Махель, Диас
Гарсия Орестес де Хесус, Доресте
Браун Мириам (CU)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к области фармацевтической химии и касается фармацевтической композиции соединений, которые проявляют сочетанное действие на холинергические, глутаматергические и митохондриальные системы, пораженные при болезни Альцгеймера (БА), имеющих общую формулу I



где заместители R₁ и R₂ определены в описании и формуле изобретения. Композиция на основе этих соединений обладает повышенной эффективностью и переносимостью при пероральном, сублингвальном, парентеральном, трансдермальном и назальном введении. Их можно применять отдельно в качестве монотерапии, заменяя терапию несколькими препаратами, применяемую в настоящее время при БА. Композиция на основе этих соединений, их солей, гидратов, энантиомеров, изомеров, метаболитов, пролекарств для введения людям в качестве активных ингредиентов для лечения БА обеспечивает повышенную биодоступность, время пребывания активного ингредиента и адекватную экскрецию, что повышает эффективность, биобезопасность, переносимость и толерантность к лечению.

A1

202391591

202391591

A1

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ПРОИЗВОДНЫХ НАФТАЛИНА В КАЧЕСТВЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ НЕСКОЛЬКИХ МИШЕНЕЙ, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

5

Настоящее изобретение относится к области фармацевтической химии и касается фармацевтической композиции соединений формулы I, которые проявляют сочетанное действие в отношении различных механизмов холинергической, глутаматергической и митохондриальной систем, пораженных болезнью Альцгеймера (БА). Композиция на основе этих соединений обладает повышенной эффективностью и переносимостью при пероральном, сублингвальном, парентеральном, трансдермальном и назальном введении.

Настоящее изобретение особенно полезно для обеспечения эффективной композиции, в которой соединения формулы I, их соли, гидраты, энантимеры, изомеры, метаболиты и пролекарства для введения человеку рассматриваются как активные вещества или агенты для лечения БА.

С увеличением продолжительности жизни населения мира наблюдается рост нейродегенеративных заболеваний, в основном связанных со старческим слабоумием. В частности, высока заболеваемость болезнью Альцгеймера (БА) среди населения старше 60 лет (от 50% до 60%). Данное заболевание приводит к прогрессирующей деменции, характеризующейся возникновением эпизодов амнезии, дезориентацией, нарушениями исполнительной и когнитивной функций, галлюцинациями, депрессией и возбуждением.

В настоящее время точный механизм, который вызывает это заболевание сложной этиологии, все еще обсуждается. Согласно экспериментальным данным, гипотеза амилоидного каскада и гипотеза фосфорилирования тау-белка играют фундаментальную роль в его происхождении (Hardy JA, et al. in Science, 1992; 256: 184-5; Haass C. et al. in Cold Spring Harb Perspect Med. 2012; 2: a006270; Mucke L et al. in Cold Spring Harb Perspect Med. 2012; 2: a006338). Однако существуют и другие альтернативные гипотезы, подтвержденные научными данными, такие как изменение митохондриальной активности, гипотеза нейровоспаления, гипотеза о роли метаболизма (связанного с холестерином и инсулином) и дендритная гипотеза. (Castello MA et al. in Aging Res Rev. 2013; 12: 282-8; Castello MA et al. in Aging Res Rev. 2014; 13: 10-2; Drachman DA. in Alzheimers Dement 2014; 10: 372-80; Ferreira ST et

al. in *Alzheimers Dement* 2014; 10 (1 Suppl): S76-83; De Felice FG, et al. in *Diabetes* 2014; 63: 2262-72; De Felice FG in *J Clin Invest.* 2013; 123: 531-9; Cochran JN et al. in *Brain Res Bull.* 2014; 103: 18-28).

В целом, невропатология БА проявляется в виде воспалительной иммунной реакции, которая включает активацию в головном мозге как врожденной, так и адаптивной иммунных систем, что приводит к нейрохимическому каскаду, который включает агрегацию β -амилоидных пептидов (β A) и тау-белка. Предполагается, что наличие амилоидных волокон или бляшек последовательно генерирует активацию комплемента, микроглию, высвобождение цитокинов (хемокинов) и, наконец, диффузную нейротоксичность (Reitz C. in *International Journal of Alzheimer's disease.* 2012 Jan; 2012: 369808; Rodrigue K. in *Neuropsychol Rev.* 2009 December; 19 (4): 436–450. Doi: 10.1007 / s11065-009-9118-x; Bateman, RJ et al. in *Alzheimer's disease. N. Engl. J Med.* 367, 795–804, 2012; Karran, E., et al. in *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 698–712, 2011). С другой стороны, Soyon Hong et al. in *Science* (2016, doi: 10.1126/science.aad8373) описывают, что на начальной стадии бессимптомной БА наблюдается ранняя синаптическая потеря, опосредованная комплементом и микроглией, в частности, увеличением белка C1q, до отложения бляшек β A. Кроме того, известно, что участие пептида β A в его начальном состоянии агрегации имеет решающее значение для сверхэкспрессии C1q. Хроническое воспаление как иммунный ответ в головном мозге играет важную роль в прогрессирующей гибели нейронов при многих дегенеративных заболеваниях. Таким образом, фагоцитарная система, состоящая из инфильтрированных макрофагов и моноцитов, присоединенных к резидентным клеткам микроглии, продуцирует избыточные количества цитокинов, таких как фактор некроза опухоли α (TNF α), интерлейкин 1 (IL1), а также активные формы кислорода, АФК (EROS), и азота, АФА (ENOS), которые участвуют в БА. Этот набор ответов на данные стимулы запускает порочный круг разрушительных явлений, который поддерживается локализованными глиальными клетками, которые провоцируют фагоцитарную атаку, необратимо повреждающую нейроны (Malm TM, in *Neurotherapeutics* 2015, 12: 81-93; ElAli A. et al. in *Brain, Behavior, and Immunity*, 2015, doi: 10.1016 / j.bbi.2015.07.021; Michaud J.-P. et al., in *Neuron*, 85, 4, 450-2, 2015).

Митохондриальные дисфункции описаны как раннее событие в патофизиологии БА и появляются до отложения β A и дефицита памяти у пациентов с БА и у трансгенных мышей (Maurer, I., et al. in *Neurobiol. Aging* 2000, 21, 455–462; Caspersen, C. et al. in

FASEB J. 2005, 19, 2040–2041; Mosconi, L et al. in Ann. NY Acad. Sci. 2008, 1147, 180–195). Во время патогенеза БА олигомеры β A накапливаются в митохондриях, что приводит к нарушению энергетического метаболизма, повышенному окислительному стрессу (OE) и апоптозу (Lustbader, et al. in Science 2004, 304, 448–452; Caspersen, C. et al. In FASEB J. 2005, 19, 2040–2041; Manczak, et al. in Hum. Mol. Genet. 2006, 15, 1437–1449). Описано, что в исследованиях, проведенных на пациентах с БА и трансгенных мышцах, происходит постоянное снижение ферментов цикла трикарбоновой кислоты и активности цитохрома с-оксидазы (Yates, et al. in J. Neurochem 1990, 55, 1624-1630; Maurer, I., et al. in Neurobiol Aging 2000, 21, 455-462; Caspersen, C. et al. in FASEB J. 2005, 19, 2040-2041; Leuner, et al. in Mol. Neurobiol. 2012, 46, 186-193). Нечто подобное описано для митохондрий, выделенных из мозга трансгенных мышей, и в выделенных митохондриях, подвергшихся воздействию олигомеров β A, в которых также было обнаружено увеличение EO, ключевого элемента в физиологии БА (Casley, et al., in Neurobiol. Dis. 2002a. 10, 258–267; Aleardi, AM, et al., in J. Bioenerg. Biomembr. 2005, 37, 207–225; Caspersen, C. et al. in FASEB J. 2005, 19, 2040–2041; Clementi, ME et al. in FEBS Lett. 2005, 579, 2913–2918; Leuner, et al. in Mol. Neurobiol. 2012, 46, 186–193; Smith, MA, et al. in Nature 1996, 382, 120-121; Leuner, et al. in Mol. Neurobiol. 2012, 46, 186-193).

Возможный механизм митохондриальной дисфункции связан с открытием митохондриальной поры переходной проницаемости (mPTP), которая может быть вызвана перегрузкой Ca^{2+} и EO (Kroemer, G. and Reed, JC in Nat. Med. 2000, 6, 513-519), и которая индуцирует высвобождение проапоптотических факторов, таких как проапоптотический белок Вах, который способствует образованию mPTP (Jürgensmeier, JM, et al. in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 4997-5002; March, I., et al. in Science 1998, 281, 2027-2031; Narita, M., et al. in Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95, 14681-14686). Следовательно, цитохром с, который способствует апоптозу, высвобождается путем связывания с фактором активации протеаз апоптоза (APAF-1) и образования комплекса, известного как "апоптосома" (Liu, X., et al. in Cell 1996, 86, 147-157; Yang, J., et al. in Science 1997, 275, 1129-1132).

Кроме того, известно, что митохондриальная биоэнергетическая дисфункция, связанная с β A, способствует глутаматергической экситотоксичности и, следовательно, гибели клеток. Уменьшение запасов клеточной энергии затрагивает потенциал цитоплазматической мембраны, что устраняет блокаду Mg^{2+} рецепторов N-

метил-D-аспартата (NMDA). Это обеспечивает постоянную активацию эндогенным глутаматом и предполагает увеличение поступления ионов Ca^{2+} в клетку, что вызывает экситоксичность в нейронах, что связано с проблемами памяти, характерными для БА (Zádori D. in *Journal of Alzheimer 's Disease*, 2018, 62, 523–547).

5 Подтверждением этой гипотезы является продемонстрированный факт, что антагонисты глутамата уменьшают гибель нейронов, вызванную митохондриальным токсином. Эти и другие последующие данные свидетельствуют о том, что АФК, генерируемые электронной транспортной цепью и/или внутриклеточными путями, связанными с активацией глутаматного рецептора, могут быть причиной дегенерации
10 нейронов (Villegas S. in *Medicina Clínica*, 2015, 145, 2, 76-83).

Невропатологическая сложность БА указывает на то, что это многофакторное заболевание, однако с терапевтической точки зрения к нему до сих пор не подходили таким образом.

Существует только четыре препарата, одобренных регулирующими органами.
15 Они относятся к двум группам: ингибиторы ацетилхолинэстеразы (AChEI) и антагонисты рецептора N-метил-D-аспарагиновой кислоты (NMDAr) (Chiang K et al. in *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2014; 54: 381-405; Francis PT et al. in *Trends Pharmacol Sci*. 2005; 26: 104-11; Huang Y. et al. In *Cell*. 2012; 148: 1204-22.)

AChEI представляют собой донепезил, ривастигмин и галантамин. Механизм
20 их действия заключается в увеличении холинергической передачи путем ингибирования ацетилхолинэстеразы в синаптической щели, и, следовательно, они могут повышать когнитивные способности пациентов с болезнью Альцгеймера. AChEI доступны в виде различных составов, которые включают, среди прочего, формы с немедленным высвобождением, такие как таблетки, капсулы и растворы, а
25 также форму с контролируемым высвобождением для перорального введения (Villegas S. in *Medicina Clínica*, 2015, 145, 2, 76-83). Однако эти AChEI обеспечивают лишь умеренную клиническую пользу для некоторых пациентов, даже когда эти препараты вводятся в максимальных дозах с точки зрения обеспечения безопасности и переносимости. Кроме того, эти соединения вызывают побочные эффекты, включая
30 анорексию, тошноту, рвоту, диарею, боль в животе и потерю веса (in *Physicians Desk Reference* 2008, Thomson PDR et al. in *Clinical Geriatrics: Volume 2011*, 19, 1; Ali T. et al. in *PLOS ONE*, 2015, 7, 1-10; Tsoi KKF in *JAMDA*, 1-7, 2015, doi: 10.1016/j.jamda.2015.08.007).

С другой стороны, NMDA α представляют собой ионотропные рецепторы для глутамата, нейротрансмиттера, который действует как важный компонент в нейрональной синаптической пластичности и памяти. Мемантин, антагонист этих рецепторов, используется в клинической практике благодаря своему нейропротекторному действию, показанному при БА средней и тяжелой степени (National Institute for Clinical Excellence. Technology appraisal guidance 217. Donepezil, galantamine, rivastigmine and memantine for the treatment of Alzheimer's disease at www.nice.org.uk/guidance/TA217; O'Brien JT, et al. in *J Psychopharmacol Oxf Engl.* 2011; 25: 997-1019; Francis PT et al. in *Trends Pharmacol Sci.* 2005; 26: 104-11; Huang Y et al. in *Cell.* 2012; 148: 1204-22). Для снижения побочных эффектов мемантина был разработан состав с контролируемым высвобождением, который позволяет высвобождать лекарственное средство в два временных этапа (в US 5382601) и/или вводить однократную суточную дозу (в US 2006/0051416). Однако это лечение также не останавливает прогрессирование заболевания, оно оказывает благотворное влияние только на некоторых стадиях, и они сильно различаются в зависимости от пациента.

В настоящее время не существует эффективного лечения этого заболевания, что оправдывает разработку других терапевтических стратегий, направленных на поиск других мишеней этой сложной этиологии, таких как:

- Антагонисты рецептора ACh (Home-ClinicalTrials.gov [по состоянию на 21 марта 2016 г.]. Доступно по адресу: <http://www.clinicaltrials.gov/>. Zawieja P, et al. in *Geriatr Gerontol. Int.* 2012; 12: 365 –71 Frolich L, et al. *J Alzheimers Dis.* 2011; 24: 363–74).
- Ингибиторы агрегации β A (Aisen PS, et al. in *Arch Med Sci.* 2011; 7: 102–11. Caltagirone C, et al. in *Alzheimers Dis.* 2010; 20: 509–16. Salloway S, et al. in *Neurology.* 2011; 77: 1253–62. Home-ClinicalTrials.gov [по состоянию на 21 марта 2016]. доступно по адресу: <http://www.clinicaltrials.gov/>)
- Ингибитор / активатор протеазы (Yan R, et al. in *Lancet Neurol.* 2014; 13: 319–29. Vellas B, et al. in *Curr Alzheimer Res.* 2011; 8: 203–12. Xia W, et al. in *J Alzheimers Dis.* 2012; 31: 685–96.)
- Липидоснижающие препараты, такие как статины (Home-ClinicalTrials.gov [по состоянию на 21 марта 2016 г.]. Доступно по адресу: <http://www.clinicaltrials.gov/>. Wong WB. et al. in *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2013; 22: 345-58; Frolich L, et al. in *J Alzheimers Dis.* 2011; 24: 363–74.)

- Активная иммунотерапия (Panza F. et al. in Expert Rev Clin Immunol. 2014; 10: 405-19; Ryan R. JM et al. in J Alzheimers Dis. 2009; 17: 243; Winblad B. et al. in Lancet Neurol. 2012; 11: 597-604; Schneeberger A. et al. in N Engl J Med. 2014; 370: 322–33.)

5 • Пассивная иммунотерапия (Home-ClinicalTrials.gov [по состоянию на 21 марта 2016 г.] Доступно по адресу: <http://www.clinicaltrials.gov/>. Panza F. et al. in Expert Rev Clin Immunol. 2014; 10: 405-19; Salloway S. et al. in N Engl J Med. 2014; 370: 322-33; Doody RS. et al. in N. Engl J Med. 2014; 370: 311–21; Ostrowitzki S. et al. in Arch Neurol. 2012; 69: 198–207).

10

Ни одна из этих терапевтических стратегий не была одобрена для применения у людей, и на сегодняшний день они не доказали свою эффективность, и подавляющее большинство из них имеют отрицательные или противоречивые результаты. При разработке всех этих стратегий не была задействована концепция разработки соединения, способного положительно взаимодействовать с различными мишенями, вовлеченными в церебральный метаболизм, у субъектов, страдающих БА.

15 Carrazana et al. (в WO2010118706 A4) заявляют о синтезе новых нейтральных липофильных и низкомолекулярных соединений, которые проходят через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и прилипают к амилоидным бляшкам, и которые используются в качестве диагностических агентов с помощью методов ОФЭКТ, ПЭТ и МРТ для визуализации этих структур. В данном изобретении было указано, что указанные соединения можно применять в качестве терапевтических агентов для лечения болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона. С другой стороны, эти авторы заявляют в WO2014131374 A1 о применении этих соединений в качестве

20 терапевтических агентов для этого заболевания, поскольку они могут: ингибировать, уменьшать, вызывать рефолдинг, дезагрегировать растворимые олигомеры, префибриллярные структуры, протофибриллы и амилоидогенные волокна, а также амилоидные бляшки. Однако в этих патентах нет сведений ни об антихолинергическом, антиоксидантном, антиглутаматергическом и

25 противовоспалительном действии этих соединений, ни о том, что они являются терапевтическими агентами направленного действия, обладающими активностью в отношении нескольких мишеней, что позволяет разработать новую монотерапию, которая позволила бы преодолеть трудности, которые до сих пор существуют в

30

лечении БА. Также не заявлен эффективный состав для введения соединений формулы I, их солей, гидратов, энантимеров, изомеров, метаболитов, пролекарств для их введения человеку в качестве активных веществ или агентов лечения БА.

В настоящее время разработка лекарственных форм с контролируемым высвобождением практически связана с использованием полимерных материалов с очень точными характеристиками в области биофармацевтики. Благодаря этому они способны поддерживать концентрацию лекарственного средства на терапевтическом плато с помощью однократной дозы, а также высвободить его непрерывно в течение заданного времени (Rodriguez, IC; Cerezo, A.; Salem, in *Bioadhesive delivery systems*. *Ars Pharmaceutica*, 2000, 41, 1, 115-128; Vintiloiu, A., Leroux, JC in *Organogels and their use in drug delivery*. *Journal of Controlled Release*, 2008, 125, 179-192). В матричных системах активный агент равномерно распределен в полимере - либо в виде суспензии, либо в виде раствора, и кинетика его высвобождения будет зависеть от структуры матрицы и химической природы используемых материалов (Frenkel, J., in *Rubber Chemistry and Technology*, 1940, 13, 264-274; Tanaka et al. In *Encyclopedia of Polymer Science*, 1986, 2nd ed. 6, 514; Fyfe, CA, Blazer, AI, in *Journal of Controlled Release*, 1998, 52, 221-225). Вспомогательные вещества замедленного или модифицированного действия, которые применяют для приготовления матричных таблеток, могут представлять собой нерастворимые или инертные полимерные матрицы, липидные или водонерастворимые матрицы, или гидрофильные матрицы.

Гидрофильные матрицы получают путем смешивания активного агента с гидрофильными полимерами, что приводит к образованию полимерных матриц. Эфиры целлюлозы представляют собой гидрофильные полимеры, широко используемые при разработке систем с контролируемым высвобождением, которые являются биологически совместимыми и нетоксичными. Среди наиболее известных: гидроксипропилметилцеллюлоза (HPMC), гидроксипропилцеллюлоза (HPC), карбоксиметилцеллюлоза натрия (СМС Na), метилцеллюлоза (МС), этилцеллюлоза (ЕС) и полисахариды микрокристаллической целлюлозы и их производные, оксиды полиэтиленглицина, хитозан полиэтиленгликолей, поливиниловый спирт, ксантановая камедь, сополимеры малеинового ангидрида, поливинилпирролидон, крахмал и полимеры на основе крахмала, мальтодекстрины, поли-2-этил-2-оксазолин, полиэтиленимин, гидрогель полиуретан, сшитые полиакриловые кислоты и их производные. Составы, в которых используются эти матрицы и другие подходящие

вспомогательные вещества, можно получать в виде таблеток или помещать их в жесткие желатиновые капсулы (Dabbagh, MA, et al. In International. Journal of Pharmaceutics, 1996, 140, 85-95)

В последнее время большой интерес вызывало изучение интраназального пути доставки лекарственного средства в мозг за счет высокой проницаемости носового эпителия, что позволяет вводить лекарственные средства с более высокой молекулярной массой, при этом высокая скорость абсорбции лекарственного средства и профили концентрации в плазме иногда почти идентичны этим показателям после внутривенных инъекций (Michael IU, et al. in J Pharmacol 2001; 53: 3-22). Другими преимуществами этого пути являются: большая площадь поверхности для всасывания лекарственных средств, лучшая приверженность лечению у пациента, быстрое получение терапевтических уровней в крови, отсутствие агрессивных состояний и отсутствие эффекта первого печеночного прохода.

В литературе описано, что поглощение лекарственного средства в головном мозге из слизистой оболочки носа происходит главным образом тремя различными путями (Illum L. in Eur J Pharm Sci 2000; 11: 1-18; Frey WH II. in Drug Deliv Tech 2002; 2: 46-49. Vyas TK, et al. в Curr Drug Deliv 2005; 2 (2): 164-175). Одним из них является системный путь, при котором лекарственное средство абсорбируется системным кровотоком и затем попадает в мозг путем прохождения через ГЭБ. Двумя другими прямыми путями являются обонятельный путь и тройнично-нейронный путь, по которым лекарственное средство частично перемещается из носовой полости в спинномозговую жидкость (ЦСЖ) и ткань мозга (Thorne RG, et al. in Neuroscience 2004; 127: 481-496). Для осуществления доставки лекарственного средства в ЦНС лекарственные средства должны эффективно и быстро проникать через слизистую оболочку носа. Таким образом, конструкция лекарственной формы играет критическую роль в фармакокинетике и биодоступности после интраназального введения. Удержание лекарственного средства в месте всасывания и близкий контакт являются двумя важными факторами, которые следует учитывать при составлении лекарственной формы. Известно, что по мере увеличения вязкости состава увеличивается время удержания состава в полости носа и, следовательно, вероятность абсорбции (Pires, A, et al. В J Pharm. Pharmaceut Sci. 2009; 12 (3): 288-311). С другой стороны, слизистая оболочка носа и слизистый слой содержат широкий спектр ферментов, для которых было опробовано несколько методик для предотвращения

ферментативной деградации, включая применение ингибиторов протеазы и пептидазы (Pires, A, et al. in J Pharm. Pharmaceut Sci. 2009; 12 (3): 288-311). Также существуют промоторы абсорбции, которые продуцируют обратимые модификации эпителиального барьера, увеличивают проницаемость этого барьера путем
5 модификации липидной мембраны, увеличивают ее текучесть или открывают межклеточные пространства, что увеличивает парацеллюлярный транспорт. Эти соединения связаны с увеличением повреждения тканей, однако некоторые соединения, такие как хитозан, циклодекстрины и некоторые производные фосфолипидов, демонстрируют увеличение абсорбции и биодоступности, что
10 перевешивает любой негативный эффект, возникающий в результате модификации слизистой оболочки (Pires, A. et al. in J Pharm. Pharmaceut Sci. 2009; 12 (3): 288-311; Casettari, L. и Illum, L. in J. Control. Release 2014, 190, 189-200).

Мукоадгезивные соединения обеспечивают связывание фармацевтической формы со слоем слизистой оболочки, что увеличивает время контакта между
15 слизистой оболочкой и лекарственным средством и способствует всасыванию. К ним относятся агароза, хитозан, желатин, каррагинан, пектин, производные целлюлозы, полиакрилаты, ПЭГ, метакрилат, акриловая кислота, PVA аминодекстран, хитозан-ЭДТА, РАС, альгинат, карбоксиметилцеллюлоза и ее натриевая форма (СМС и Na-СМС), гидроксиэтилированный крахмал, поливинилпирролидон (PVP),
20 тиолированные полимеры, полиакриловая кислота (Mansuri, S. et al. in React. Funct. Polym. 100 (2016) 151 –172).

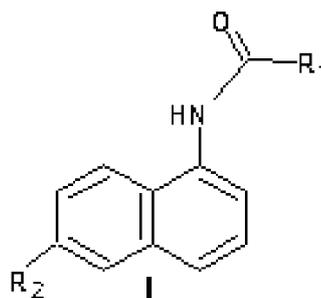
Интраназальный путь можно применять для транспортировки лекарственных средств с низкой молекулярной массой (менее 1000 Да) (Behl CR, et al. in Adv Drug Del Rev 1998; 29 (1): 89-116). В различных патентах заявлены различные подходы к
25 доставке этих малых молекул в ЦНС.

Quay, S.C. et al. (в US20030225031A1 (2003) и в US20060003989A1 (2006)) заявляют фармацевтические композиции для лечения деменции, БА, расстройств обучения, синдрома отмены никотина при помощи ингибиторов ацетилхолинэстеразы (донепезил, такрин, ривастигмин, галантамин и другие), которые содержат жидкий
30 раствор, гель или порошок для назального введения лекарственного средства и усилитель проницаемости для трансмукозальной абсорбции лекарственного средства в ЦСЖ путем интраназального введения.

Went G.T. et al в US20050245617A1 (2005) заявляют фармацевтическую композицию, содержащую антагонист рецептора N-метил-D-аспартата (NMDA) (мемантин), ингибитор моноаминоксидазы (MAO) или ингибитор ГАДФН (селегилин) и фармацевтически приемлемый носитель; указанную композицию вводят в виде лекарственной формы с длительным высвобождением для перорального, местного трансэпителиального, подкожного, внутривенного, интраназального или ингаляционного введения для лечения состояний, связанных с ЦНС, таких как болезнь Паркинсона, рассеянный склероз и БА. Эти авторы в US20060252788A1 (2006) заявляют композицию, в которой они объединяют мемантин с донепезилом, а в US20060189694A1 (2006) они раскрывают композицию производного аминоксамантина (мемантин, римантадин, амантадин) и ингибитора декарбоксилазы (леводопа, карбидопа) или ингибитора катехол-О-метилтрансферазы (талкапон, энтакапон) вместе с носителями в лекарственной форме с пролонгированным высвобождением для лечения различных нейродегенеративных состояний.

Cummings, C.J., et al. в US20070037800A1 (2007) заявляют интраназальный способ лечения неврологических расстройств, таких как болезнь Хантингтона или БА, путем применения клотримазола и его производных. С другой стороны, *Tao, T. et al.* в CN1621039 (2005) раскрывают биодоступный состав гиперзин-А и его производного или соли, который вводят назально для профилактики и лечения старческого слабоумия и улучшения памяти и способности к обучению у подростков.

Настоящее изобретение относится к области фармацевтической химии и относится к фармацевтической композиции соединений формулы I, которая проявляет сочетанное направленное действие в отношении холинергической, глутаматергической и митохондриальной систем, пораженных при болезни Альцгеймера (БА). Композиция на основе этих соединений обладает повышенной эффективностью и переносимостью при пероральном, сублингвальном, парентеральном, трансдермальном и назальном введении.



где:

R₁: -алкиленил-C(O)NH-алкиленил-R₃, -алкиленил-C(O)O-R₄;

R₃: -COOH, -OH, -SH, -NH₂, -NH-алкил-, -NH-алкиленил-NH₂, -NH-алкиленил-NH-C(O)-алкиленил-S-R₅, -NH-дитиокарбамат-алкил, соли щелочноземельных металлов -N-алкилдитиокарбамата; или соли указанных выше групп, фармацевтически приемлемые.

R₄: сукцинимидильная группа;

R₅: -H, -C(O)-алкил, -C(O)-C₆H₅; и

R₂: -H, -алкил.

10 Термин «алкил» характеризуется тем, что представляет собой неразветвленную или разветвленную алифатическую цепь из насыщенных атомов углерода и атомов водорода, предпочтительно метил или этил. Термин «алкиленил» относится к двухвалентному аналогу неразветвленной или разветвленной алкильной группы, предпочтительно метиленилу (-CH₂-), этиленилу (-CH₂CH₂-) или пропиленилу (-CH₂CH₂CH₂-).

В частности, соединения формулы I в виде составов можно применять отдельно в качестве замены для терапии несколькими препаратами, которую применяют в настоящее время, где для улучшения симптомов БА используется комбинация нескольких активных агентов. Соединения формулы I индивидуально 20 обладают антихолинергической, антиоксидантной, антиглутаматергической и противовоспалительной активностью, что делает их мощными активными агентами для монотерапии БА. Кроме того, они способны ингибировать агрегацию амилоидогенных пептидов и образование бляшек (см. WO2010118706 A4). При этом пациент получает монотерапию, которая значительно улучшает клинические 25 симптомы и биологические изменения, присутствующие в головном мозге субъектов, страдающих БА.

Состав, представленный соединениями формулы I, их солями, гидратами, энантиомерами, изомерами, метаболитами, пролекарствами для их введения человеку в качестве активных веществ или агентов для лечения БА, позволяет повысить 30 биодоступность, время пребывания активного агента и адекватную экскрецию, что повышает эффективность, биобезопасность, приверженность и толерантность пациентов к лечению, посредством перорального, сублингвального, парентерального, трансдермального и назального введения.

Соединения формулы I могут быть легко получены, как описано в патенте Кубы № 2009-57, PCT-CU2010-000001.

В настоящем изобретении соединения формулы I неожиданно проявляют митопротекторные свойства. На фиг. 2 (из неограничивающего Примера 1) показано влияние соединения **1** на диссипацию потенциала митохондриальной мембраны ($\Delta\psi$), связанного с потоком электронов через белковые комплексы цепи переноса электронов (СТЕ). Митохондрии, обработанные этилен-бис (оксиэтиленитрил) тетрауксусной кислотой (EGTA), демонстрируют наименьшую диссипацию митохондриального потенциала, поскольку это контрольная группа эксперимента. В этом случае EGTA действует как хелатор загрязнителя Ca^{2+} в реакционной среде, так что митохондрии находятся в наилучшем состоянии и сохраняют свой потенциал в максимальной степени. Контрольная группа EGTA + 3-хлорфенилдрозона карбонилцианид (СССР) представляет собой группу, в которой происходит повреждение митохондрий, поскольку СССР диссипирует $\Delta\psi$, действуя как разветвитель окислительного фосфорилирования. Соединение **1** в диапазоне концентраций от 0,1 мкмоль/л до 100 мкмоль/л демонстрирует значения потенциальной диссипации, аналогичные контрольной группе (EGTA). Согласно этим результатам, соединение **1** в тестируемом диапазоне доз снижает восприимчивость к диссипации потенциала.

На фиг. 3 показаны результаты оценки набухания митохондрий, вызванного 50 мкмоль/л Ca^{2+} и 2 ммоль/л неорганического фосфата (Pi), которое оценивали спектрофотометрически по снижению поглощения при 540 нм. В данном случае было отмечено, что в контрольной группе (в присутствии Ca^{2+}) показаны максимальные значения оптической плотности как критерий максимального набухания. С другой стороны, образцы, обработанные EGTA (хелатором Ca^{2+}), показали низкие значения поглощения ($p < 0,001$), поскольку это был неповрежденный контроль. Группа, получавшая СССР, также демонстрирует низкие значения поглощения ($p < 0,001$), поскольку при разобшении он предотвращает проникновение ионов Ca^{2+} и, таким образом, предотвращает набухание митохондрий. Соединение **1** в аналогичных концентрациях обращает вспять эффект набухания, вызванного Ca^{2+} , поэтому его можно рассматривать как защитника целостности и функциональности митохондрий. Эти эффекты соответствуют наблюдаемому воздействию на диссипацию мембранного потенциала митохондрий.

Также оценивали влияние соединения **1** на продукцию пероксида водорода (H_2O_2), что непосредственно связано с состоянием сохранения потенциала митохондриальной мембраны ($\Delta\psi$). В базальных условиях митохондрии продуцируют большие количества реакционноспособных частиц, что подтверждается в контрольной группе, получавшей EGTA. Когда проводилась обработка СССР, наблюдалось аналогичное поведение (фиг. 4, из неограничивающего Примера 1), но в этом случае был сделан вывод, что генерация реакционноспособных частиц связана с разобщением, которое индуцирует СССР, а не с продукцией АТФ митохондриальной АТФазой, то есть с оптимальным состоянием функциональности митохондрий. Обработка соединением **1** защищает от продукции H_2O_2 в исследуемом диапазоне доз.

Таким образом, наши результаты показывают, что это соединение действует как защитный агент митохондриальной функции, поскольку митохондрии были менее восприимчивы к диссипации мембранного потенциала, оно уменьшает набухание и образование активных форм кислорода.

Судя по исследованиям *in silico*, соединения формулы **I** взаимодействуют с ферментом АСhЕ аналогично донепезилу. Эти взаимодействия являются гидрофобными с аминокислотами Trp 84, Trp 279 и Phe 330. Таким же образом эти соединения взаимодействуют со всеми остатками серина в полости, участвующими в реакции с ацетилхолином, путем образования трех водородных связей, которые придают стабильность связи лиганд/фермент, что указывает на то, что соединения могут блокировать активность фермента. Модель амнезии, вызванной скополамином (ESC), является одной из наиболее широко применяемых для индуцирования когнитивных нарушений, связанных с деменцией и старением (*Bajo R, et al. in Scientific reports 2015, 5: 9748; Gilles C and Ertle S. in Dialogues Clin. Neurosci. 2000, 2 (3): 247-255; Haider S et al. in Brain Res. Bull. 2016, 127 (Supplement C): 234-247*). Применение этого конкурентного неселективного антагониста мускаринового холинергического рецептора является эффективным способом блокирования холинергической нейротрансмиссии и, таким образом, индуцирования деменции. Также ESC индуцирует повышение активности фермента ацетилхолинэстеразы АСhЕ, что способствует вместе с блокированием рецепторов дефициту холинергической нейротрансмиссии. Эта модель используется в испытаниях *in vivo* ингибиторов активности ферментов, таких как донепезил (*Shin CY, et al. in Biomolecules & Therapeutics 2018, 26 (3): 274-281*). Наряду с этими эффектами наблюдаются другие

механизмы, такие как индукция ЕО, нейровоспаление, митохондриальная дисфункция, снижение фосфорилирования цАМФ и негативная регуляция NFDB (нейротропный фактор, полученный из мозга), и глиальный кислотный фибриллярный белок (GFAD) (*Haider et al., in Brain Research Bulletin 2016, 127, 234-247; Jung et al., in Biol. Pharm. Bull. 2009, 32 (2), 242 -246; Konar et al., in PLOS ONE, 2011, 6, 11, e27265; Lee et al., in Scientific reports, 2015, 5, 9651.; Wong-Guerra et al., in Neurol Res. 2017; 39 (7), 649-659*), и все они способствуют когнитивной дисфункции, наблюдаемой в этой модели.

Поведенческая оценка в модели однократного ESC была выполнена с использованием «пространственной версии» Y-лабиринта, которая позволяет оценить кратковременную пространственную память (*McGaugh JL, in Science, 153 (1966) 1351*) и основана на способности животных спонтанно распознавать новые пространства в лабиринте. Память, оцененная в этом протоколе, включает функцию гиппокампа (*Csiszar A., et al. in Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. (2013), 305 H1120-1130; Olton DS and Paras BC, in Neuropsychologia, 17 (1979) 669-682.*)

На фиг. 5 (неограничивающий пример 2) показаны результаты поведенческого теста в Y-образном лабиринте для соединения метил(2-{[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]амино}этил)дитиокарбамат (**3**) по оценке в модели ESC. В этом эксперименте было отмечено, что животные контрольной группы отдают предпочтение новому рукаву, о чем свидетельствует значительное уменьшение времени, проведенного в двух знакомых рукавах ($p < 0,001$). Этот предпочтительный поведенческий профиль не воспроизводился при введении ESC за 30 минут до тренировки. В этом случае время, проведенное в новом рукаве, уменьшилось, без каких-либо статистически значимых различий, наблюдаемых в отношении двух других рукавов. Напротив, в группе, где вводили соединение **3** (дозы от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг), амнезия, индуцированная ESC, была в значительной степени обращена вспять ($p < 0,001$). Таким образом, животные демонстрировали предпочтительный поведенческий профиль, аналогичный профилю контрольной группы, характеризующийся значительным увеличением пребывания в новом рукаве по сравнению со знакомыми рукавами. В этом исследовании донепезил (положительный контроль; доза: 1 мг/кг, в/бр), введенный за 30 минут до испытания, также обратил вспять дефицит, вызванный ESC, что согласуется с другими авторами и с антихолинергическими эффектами этого препарата (*Lee JS, et al. in Scientific reports*

2015, 5: 9651; Riedel G, et al. in *Behav. Brain Res.* 2009, 204 (1): 217-225). Таким образом, наши результаты показывают, что соединение **3**, вводимое в однократных дозах в диапазоне от 0,1 до 10 мг/кг за 30 минут до тренировки, неожиданно предотвращает амнестический эффект, вызванный введением ESC. Сравнивали время пребывания в новом рукаве для различных экспериментальных групп (фиг. 6, неограничивающий пример 2). Таким образом, время контрольной группы по сравнению с ESC показало явное снижение в группе ESC (контроль: $133,8 \pm 9,3$ сек; ESC: $98,8 \pm 4,2$ сек), которое было статистически значимым ($p < 0,001$). Поведение животных в группах, получавших соединение **3**, зависело от вводимой концентрации. До дозы 1 мг/кг наблюдалось постепенное увеличение времени обследования, значительно отличающееся от группы ESC ($p < 0,01$). При более высоких дозах наблюдалось снижение этого параметра. В случае группы, получавшей донепезил, как и ожидалось, время пребывания было значительно больше, чем у ESC. Таким образом, в этом опыте доза соединения **3** из 1 мг/кг показала себя в качестве дозы с наибольшим эффектом.

Для изучения долговременной памяти (McGaugh JL, in *Science*, 153 (1966) 1351) был разработан «водный лабиринт» (называемый водным лабиринтом Морриса, ВЛМ; Morris R, in *Journal of Neuroscience Methods* 1984, 11 (1): 47-6). Было показано, что эта поведенческая модель репрезентативна для оценки зависящей от гиппокампа пространственной навигации и эталонной памяти. Для нее сообщается о двухдневном протоколе ВЛМ, который основан на начальной серии учебных тестов с видимой платформой с последующим тестом памяти через 24 часа, но уже со скрытой платформой (Gulinello M, M. Gertner et al. in *Behav. Brain Res.*, 196 (2009) 220-227). Этот протокол был валидирован у пожилых (15-18 месяцев) тройных трансгенных (3xTG) мышей. Критерием, который оценивается, является разница и/или отношение латентности спасения: для последнего теста обучения с видимой платформой и для первого теста со скрытой платформой (через 24 часа). Таким образом, животные, которые выработали правильную пространственную стратегию, быстро перемещаются к области скрытой платформы, что указывает на то, что их долгосрочная память сохранилась нетронутой. Напротив, животные, которым требуется время, чтобы найти скрытую платформу, имеют сбои в долгосрочной пространственной памяти и более высокую латентность спасения.

На фиг. 7 (неограничивающий пример 2) показаны результаты поведенческой оценки для соединения **3** в модели однократного ESC с использованием ВЛМ. Результаты свидетельствуют о том, что у мышей, которым вводили ESC, был дефицит долгосрочной пространственной памяти, а мыши, получавшие соединение **3**, такого дефицита не имели. Арифметическая разница, а также соотношение времени латентности в последнем обучающем тесте с видимой платформой и времени латентности в первом тесте со скрытой платформой показывает, что группа, обработанная соединением **3**, значительно отличается от группы ESC. Таким образом, результаты данного эксперимента подтверждают результаты, полученные в предыдущем опыте по кратковременной пространственной памяти.

У этих животных активность AChE (мкмоль/л/мин/мг белка) определяли *ex vivo* в образцах растворимой фракции гомогенатов головного мозга (фиг. 8, неограничивающий пример 3). Результаты показывают, что наблюдалось значительное увеличение ($p < 0,001$) активности AChE в группе лечения ESC по сравнению с контрольной группой. Однако активность AChE была неожиданно значительно снижена в группе, получавшей **3** ($p < 0,05$), по сравнению с группой ESC, и, как и ожидалось, в группе, получавшей додзепил ($p < 0,01$).

Модель длительного введения ESC недавно стала еще одной альтернативой в экспериментальной оценке новых агентов для лечения БА (*Klinkenberg I and Blokland A, in Neurosci Biobehav Rev 2010, 34 (8): 1307-1350*). У грызунов индуцируют когнитивную дисфункцию за счет введения серийных доз ESC (внутрибрюшинно) в течение 10 последовательных дней со скоростью введения один раз в сутки. При этой модели сохраняются некоторые характеристики, которые проявляются в модели с однократным введением, и появляются другие характеристики, которые лучше связаны с БА. Таким образом, происходит дегенерация холинергической системы, такая как повышение активности/экспрессии ацетилхолинэстеразы, снижение активности/экспрессии фермента синтеза холиноацетилтрансферазы и дефицит активного потребления холина на пресинаптическом терминальном уровне (*Haider, S. et al. in Brain research bulletin, 2016, 127, 234-247*). Также наблюдается повышение экспрессии белка-предшественника амилоида (A β PP) и присутствие агрегатов β A и гиперфосфорилированного тау (*Bihaqi SW, et al. in Indian J. Pharmacol. 2012, 44 (5): 593-598; Ramandeep K, et al. in Int J Prev Med Res. 2015. Vol. 1, No. 2, pp. 45-64*).

На фиг. 9 (неограничивающий пример 4) показаны результаты поведенческой оценки долгосрочной памяти для соединения **3** в модели с длительным введением ESC (суточная доза 1,5 мг/кг, 2 недели). Соединение **3** вводили за три дня до введения ESC и в течение следующих двух недель введения ESC. Результаты теста ВЛМ указывают на дефицит памяти у мышей, которым вводили ESC. С другой стороны, в случае групп, которым вводили соединение **3** (1 и 10 мг/кг), соотношение первой латентности спасения в тесте со скрытой платформой (Т7) и в последнем тесте с видимой платформой (Т6) значительно уменьшилось по сравнению с группой ESC. Результаты показывают, что доза 1 мг/кг показала себя в качестве дозы с наибольшим эффектом. Таким образом, результаты показывают, что в этой модели индуцируется дегенерация холинергической системы, о чем свидетельствует дефицит долговременной пространственной памяти в тесте ВЛМ, что предотвращается при применении соединения **3**.

Признано, что эксцитотоксичность, опосредованная глутаматным рецептором, может лежать в основе патофизиологии ряда неврологических аномалий, включая БА и болезнь Паркинсона (БП). Глутамат играет центральную роль в развитии нервной системы, передаче и синаптической пластичности при нормальных физиологических условиях. Кроме того, этот нейротрансмиттер участвует в процессах памяти и обучения. При острых цитотоксических явлениях, таких как гипоксия-ишемия, или при хронических нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, концентрации глутамата повышаются в ткани головного мозга в ответ на различные патологические факторы, и это явление вызывает гибель нейронов, особенно из-за увеличения внутриклеточных концентраций Ca^{2+} . Неожиданно было обнаружено, что соединения формулы **I** в тестах *in vitro* обладают нейропротекторным действием против индуцированного глутаматом эксцитотоксического повреждения, как показано неограничивающим образом в примере 5 и на фиг. 10. Здесь клетки SH-SY5Y предварительно обрабатывали соединением **3** (1,8-60 мкмоль/л) в течение 24 часов, а затем совместно инкубировали с теми же концентрациями соединения **3** и 60 ммоль/л глутамата (24 часа). Соединение **3** значительно снижало ($p < 0,05$) гибель нейронов при концентрациях 7,5 и 15 мкмоль/л. Эти результаты позволяют предположить, что нейропротекция может дифференциально регулировать метаболизм митохондрий.

На эксцитотоксическую гибель клеток также влияют другие рецепторы в глутаматергической системе. Таким образом, можно экспериментально индуцировать повреждение путем введения каиновой кислоты (КА) или α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA), как мощных агонистов глутамата (Wang Q, et al. in *Mol Neurobiol.* 2005, 31: 3–16). Известно, что введение КА грызунам вызывает рецидивирующие судороги, поведенческие изменения и последующую дегенерацию нейронов, в частности, областей CA1 и CA3 гиппокампа (Wang Q, et al. *B Mol Neurobiol.* 2005, 31: 3-16). Гибель нейронов, вызванная КА, сопровождается увеличением активации микроглии и астроцитов, увеличивая генерацию воспалительных цитокинов (Chen, Z. et al. *B J. Neurobiol.*, 2005, 62 (2), 207-218). Кроме того, активация рецепторов КА вызывает деполяризацию митохондриальной мембраны и, как следствие, изменение внутриклеточных концентраций Ca^{2+} (Brorson, JR et al. in *J. Neurosci.*, 1994, 14 (1), 187-197). Таким образом, индуцируется повреждение в митохондриальной функции (Wang, Q. et al. in *Mol. Neurobiol.*, 2005, 31 (1-3), 3-16) и увеличение генерации ROS и ENOS, генерирующих OE и нитрозативный стресс (NE), которые индуцируют гибель клеток своими вредными нейронными действиями (Ueda, Y. et al. in *Exp. Brain Res.* 2002, 147 (2), 219-226).

По нашему опыту, у животных контрольной группы КА в течение 10-20 минут после инъекции КА наблюдались неподвижность, движения пасти и мордочки и жесткие позы, а в некоторых случаях - тонико-клонические припадки средней интенсивности. В течение следующих 20-60 минут наблюдались кивание, повторяющиеся движения и подъем и падение, а затем непрерывные подъемы и падения до тех пор, пока, наконец, не возникли более тяжелые тонико-клонические припадки. Однако у животных, получавших соединение **3** (дозы: 5 и 50 мг/кг), эти эффекты неожиданно проявлялись с меньшей частотой и интенсивностью (фиг. 11, неограничивающий пример б). На фиг. 11 показано значительное снижение общего балла (0-120 минут) в группах, получавших соединение **3** (5 и 50 мг/кг), причем эффект был больше при дозе 50 мг/кг.

Соединения формулы **I** до сих пор не были приготовлены в виде составов, поэтому фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению являются уникальными, которые учитывают физико-химические свойства этих соединений и, в частности, массовые соотношения ингредиентов в композициях. Таким образом, представленные составы гарантируют свойства этих терапевтических агентов,

обладающих активностью в отношении нескольких мишеней, с антихолинэргическим, антиоксидантным, антиглутаматергическим и противовоспалительным действием. Эти составы обеспечивают длительную дозу эффективных концентраций активного ингредиента в плазме, что обеспечивает его эффективность, не описанную до сих пор, и позволяют повысить приверженность и толерантность пациента к лечению посредством перорального, сублингвального, парентерального, трансдермального и назального введения.

Фармацевтические составы соединений формулы I, их солей, гидратов, энантимеров, изомеров, метаболитов, пролекарств для введения человеку согласно настоящему изобретению включают подходящие вспомогательные вещества и могут быть в твердой, полутвердой, желатиновой или жидкой форме, такой как таблетки, капсулы, суспензии, эмульсии, парентеральные растворы, трансдермальные пластыри, назальные растворы, мукоадгезивы и другие. Как правило, состав будет содержать от 0,1 до 99%, предпочтительно от 1 до 80% активного соединения, вместе с носителем или компонентами состава. Вспомогательные вещества представляют собой жидкие, твердые или полутвердые вспомогательные вещества, соединения органической и неорганической природы, природного или синтетического происхождения, физиологически приемлемые и обычно используемые в составах активных агентов.

Предпочтительной фармацевтической формой в данном изобретении являются таблетки, которые вводят по меньшей мере один раз в день и которые содержат терапевтически активный ингредиент, выбранный из группы соединений формулы I, или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый носитель твердой, полутвердой, желатиновой или жидкой полимерной матрицы. Лекарственные формы согласно настоящему изобретению обеспечивают высвобождение терапевтически активного агента в течение от 2 до 24 часов, когда указанную форму подвергают воздействию водных растворов. После введения указанного состава скорость растворения активного агента составляет более 80% в период от 6 до 18 часов, и эффективный уровень лекарственного средства в плазме поддерживается в течение 24 часов. Активный ингредиент присутствует в количестве от примерно от 1 до 100 мг на состав.

В настоящем изобретении в таблетках в качестве полимеров, в частности, применяют следующие: полиэтиленоксид, гидроксипропилметилцеллюлоза (HPMC), гидроксипропилцеллюлоза (HPC), карбоксиметилцеллюлоза натрия (CCNa),

производные целлюлозы, Eudragit RS PO, поливинилпирролидон или их комбинации. В составах с модифицированным высвобождением в течение 24 часов полимер присутствует в количестве от 5 до 80% масс./масс., предпочтительно от 10 до 70 % масс./масс. В препаратах с модифицированным высвобождением через 12 часов полимер предпочтительно присутствует в количестве от 5% масс./масс. до 50% масс./масс. Составы получают обычным способом, описанным в литературных источниках.

На фиг. 12, 13 и 14 показаны профили контролируемого высвобождения трех составов в виде таблеток, которые не следует рассматривать как ограничивающие настоящее изобретение (примеры 7, 8 и 9), для получения таблеток с активными агентами: (N-[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]-β-аланин (1), 6-{[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]амино}гексановая кислота) (2) и метил(2-{[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]амино}этил)дитиокарбамат (3). Эти составы содержат 10 мг активного агента и другие добавки, такие как крахмал в качестве связующего вещества, микрокристаллическая целлюлоза в качестве разрыхлителя, лактоза в качестве разбавителя, диоксид кремния в качестве вещества, способствующего скольжению, и стеарат магния в качестве смазывающего вещества, в различных пропорциях, и в качестве полимерных матриц использовали: НМРС, НРС и Eudragit RS PO. На фиг. 12, 13 и 14 показано, что в трех составах присутствуют две фазы высвобождения, зависящие от pH среды. Таким образом, после 60 минут взаимодействия таблеток (НМРС, НРС и Eudragit RS PO) и кислой среды, не содержащей ферментов, высвобождение активных агентов из матрицы было незначительным, с высвобождением менее 1% активного агента. С другой стороны, когда таблетки трех составов подвергали воздействию буферного раствора с pH 7,5, процесс высвобождения активных агентов постепенно увеличивался, обеспечивая почти полную доставку, более 96%, в среду в течение 24 часов. Это высвобождение происходит для трех активных агентов, приведенных в качестве неограничивающих примеров.

Эти профили высвобождения трех составов, не ограничивающих настоящее изобретение, ясно показывают, что при изменении pH происходит увеличение наклона кривой растворения, что означает, что происходит сверхурочное устойчивое высвобождение активного агента. Подтекст этой схемы высвобождения для применения у людей предполагает, что высвобождение происходит в две стадии, где

происходит постепенное и умеренное увеличение концентрации активного агента в крови, и тем самым нежелательные побочные эффекты уменьшаются. Это особенно эффективно для предотвращения возможных желудочных побочных эффектов, поскольку в желудке выделяется всего лишь примерно 1% содержания активного ингредиента. Кроме того, надежное медленное высвобождение, как правило, при длительных интервалах дозирования, улучшает фармакологический эффект у пациента, тем самым повышая приверженность лечению и толерантность.

Таким образом, составы соединений Формулы I в виде таблеток согласно настоящему изобретению имеют оптимальный профиль высвобождения. Для целей настоящего изобретения применяют доступные полимерные матрицы, так что таблетки могут быть получены простым и экономичным способом с включением физиологически совместимых компонентов, что обеспечивает композиции с пролонгированным высвобождением в двух фазах, которые облегчают дозировку, не вызывая нежелательных побочных эффектов.

Трансдермальная система, разработанная в настоящем изобретении, состоит из следующих последовательных слоев: а) липофильного защитного наружного слоя; б) слоя, содержащего активный агент Формулы I, в форме геля, суспензии, эмульсии или в другой форме; где указанное соединение включено в матрицу (которая может быть акриловой), что обеспечивает его эффективное хранение; с) двухсторонней контролирующей мембраны, которая высвобождает активный агент; д) модуля высвобождения, который включает резервуар с активным агентом и систему регуляции высвобождения лекарственного средства и в целом состоит из полимерного материала (карбоксиметилцеллюлозы (СМС), этилцеллюлозы, желатина, метилцеллюлозы, крахмала и т. д.; синтетических эластомеров: полибутадиена, полиизопрена, неопрена, полисилоксана и т. д.; синтетических полимеров: поливинилового спирта (PVA), полиэтилена, полистирена, полиуретана, поливинилпирролидона (PVP) и т. д.; е) гипоаллергенного адгезивного слоя, позволяющего фиксировать пластырь под давлением и содержащего акриловые полимеры, гипоаллергенный силикон, смолы, минеральные масла, полиизобутилен и др. и ф) внутренней защитной пленки, которую снимают перед тем, как поместить систему на кожу. Покрытие этих пластырей для местного применения обеспечивает непрерывное и мягкое высвобождение лекарственного средства через кожу в кровотоки; без побочных реакций. Заявлены два типа пластырей в зависимости от их

размера и дозировки. Один имеет площадь 5 см², дозу активного агента 5 мг и высвобождение соединения 4 мг/сутки. Другой с удвоенными пропорциями и вместимостью. Терапию начинают с суточной дозы меньшего пластыря, а в случае хорошей переносимости и минимум после 4 недель применяют больший пластырь (10 см², 10 мг/24 ч).

В назальном составе соединений формулы I, их солей, гидратов, энантиомеров, изомеров, метаболитов, пролекарств для их введения человеку в настоящем изобретении применяют различные компоненты, которые функционируют как растворитель, биоадгезив, консервант, антиоксидант и поверхностно-активное вещество/увлажнитель. Неограничивающие примеры биоадгезивных вспомогательных веществ могут представлять собой: гидроксипропилметилцеллюлозу (НМРС), гидроксипропилцеллюлозу (НРС), метилцеллюлозу (МС), карбоксиметилцеллюлозу (СМС), все в концентрации от 0,5 до 7%, и производные полиакриловой кислоты (карбола) от 0,01 до 1,5%. ПЭГ используют в качестве растворителя для активных агентов. Биоадгезивные полимеры имеют вязкость от 10 до 60 мПа·с (без ограничения) и имеют целью увеличения времени удержания в полости носа. В качестве антимикробного консерванта наполнителя предпочтительно используют бензалкония хлорид от 0,005 до 0,5% или в комбинации с динатрием ЭДГА в концентрациях от 0,002 до 0,2% и пропилпарабенот от 0,005 до 0,05%. Значение рН доводили до значения от 6 до 7,5 при помощи изотонических растворов фосфатного или цитратного буферов. Изотонизирующими агентами могут быть: хлорид натрия, маннит, сорбит, глюкоза и другие. Предпочтительным антиоксидантом является токоферол от 0,05 до 2%. В качестве смачивающих агентов используют глицерин от 3 до 6% и Tween 80 от 0,1 до 0,4%, которые позволяют повысить проницаемость. Растворителем, используемым во всех случаях, была вода для инъекций.

Интраназальное введение считается способом доставки терапевтических агентов в центральную нервную систему (ЦНС). Высвобождение лекарственного средства происходит в течение нескольких минут по обонятельным и нервным тройничным путям, внеклеточным путям, для которых не требуется связывания лекарственного средства с каким-либо рецептором или аксональной транспортной системой (*Thorne, RG et al. in Neuroscience. 2002, 127, 481-496*).

На фиг. 15 показаны результаты поведенческой оценки (Y-образный лабиринт) влияния введения назальной композиции соединения **3** на амнезию, индуцированную однократным введением ESC. Как видно, различий между контрольными группами нет, что указывает на то, что используемый состав не влияет на характеристики животных в тесте в Y-образном лабиринте. Как и ожидалось, наблюдалось значительное снижение ($p < 0,001$) времени обследования нового рукава у животных, получавших ESC, по сравнению с обеими контрольными группами. Однако животные в группе, получавшей соединение **3**, демонстрируют значения, аналогичные значениям в контрольных группах (физиологический раствор и носитель), что указывает на то, что **3** предотвращает амнезию, вызванную ESC. На фиг. 16 показаны результаты теста на дискриминацию объектов (Object Discrimination Test, ODT). Не наблюдалось существенных различий в индексе распознавания (DI) нового объекта между контрольными группами и группой, получавшей **3**. С другой стороны, в группе, получавшей ESC, наблюдалось резкое снижение DI ($p < 0,001$).

Результаты этого эксперимента показывают, что однократное введение ESC вызывает когнитивную дисфункцию как в модели с Y-образным лабиринтом, так и в ODT, аналогично тому, что наблюдалось другими авторами (*de Bruin N, et al., J Neurodegener Dis. 2015; 2015: 242505. Doi: 10.1155/2015/242505*). Наряду с этим, интраназальное введение соединения **3** предотвращает когнитивную дисфункцию в обеих моделях, что согласуется с предыдущими результатами для этого соединения, вводимого перорально, в моделях с однократным и длительным введением ESC. Интраназальное введение **3** позволяет предотвратить амнестические эффекты ESC при введении в более низких дозах, чем те дозы, которые используются при пероральном пути введения.

Приведенные ниже примеры и фигуры, которые никоим образом не следует интерпретировать как ограничивающие настоящее изобретение, иллюстрируют направленное действие фармацевтического состава соединений формулы I, их солей, гидратов, энантиомеров, изомеров, метаболитов и пролекарств, обладающих активностью в отношении нескольких мишеней, для введения людям на различные механизмы холинергической, глутаматергической и митохондриальной систем.

Описание графических материалов

Фиг. 1. Структуры и физико-химические свойства некоторых соединений формулы I, выбранных для неограничивающих примеров согласно настоящему изобретению.

Фиг. 2. Влияние соединения Формулы I (N-[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]-β-аланин (**1**) на мембранный потенциал митохондрий, выделенных из печени крыс.

Фиг. 3. Влияние соединений формулы I (N-[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]-β-аланин (**1**) на набухание митохондрий, выделенных из печени крыс. *** p < 0,001 Сравнение с контролем по t-критерию Стьюдента, p < 0,05 считали статистически значимой разницей.

Фиг. 4. Влияние соединений формулы I (N-[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]-β-аланин (**1**) на выработку активных форм кислорода в митохондриях, выделенных из печени крыс. *** p < 0,001 Сравнение с группой EGTA с использованием t-критерия Стьюдента, p < 0,05 считали статистически значимой разницей.

Фиг. 5. Антихолинергический модулирующий эффект соединения метил(2-{[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]амино}этил)дитиокарбамат (**3**) в модели потери памяти, вызванной однократным введением скополамина (ESC). Кратковременная пространственная память в Y-образном лабиринте после сеанса знакомства в группах контроля, ESC и группах, обработанных однократными дозами **3** (0,1, 1, 10 и 20 мг/кг, внутривенно). * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием Тьюки.

Фиг. 6. Антихолинергический модулирующий эффект соединения метил(2-{[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]амино}этил)дитиокарбамат (**3**) в модели потери памяти, вызванной однократным введением скополамина (ESC). Время пребывания в новом рукаве после сеанса обучения для групп контроля, ESC и лечения **3** в дозах 0,1, 1, 10 и 20 мг/кг. * p < 0,05, сравнение с контрольной группой ≈ p < 0,05, сравнение с ESC. Однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием Тьюки.

Фиг. 7. Антихолинергический модулирующий эффект соединения метил(2-{[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]амино}этил)дитиокарбамат (**3**) в модели потери памяти, вызванной однократным введением скополамина (ESC). Верхняя панель: Поведение в МРМ по двухдневному протоколу разных экспериментальных групп.

Нижние панели: Долгосрочная пространственная память, латентность спасения в последнем испытании с видимой платформой (D1T4); латентность спасения в первом испытании с видимой платформой (D2T1). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, сравнение с группой ESC. $\approx p < 0,05$, сравнение с контрольной группой. Однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием Тьюки.

Фиг. 8. Антихолинергический модулирующий эффект соединения метил(2-{[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]амино}этил)дитиокарбамат (**3**) в модели потери памяти, вызванной однократным введением скополамина (ESC). Антихолинэстеразная активность в растворимых фракциях гомогенатов головного мозга животных из модели однократного ESC контрольной группы, группы, обработанной ESC, метил(2-{[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]амино}этил)дитиокарбаматом (**3**) и донезепилом. Столбцы соответствуют среднему значению \pm SEM, $n = 10$ животных/группа. *** $p < 0,001$, сравнение с контрольной группой. $\approx p < 0,05$, $\approx\approx p < 0,01$, сравнение с группой ESC. Статистически значимой разницей считали $p < 0,05$. Используемый статистический тест: однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием Тьюки.

Фиг. 9. Антихолинергический модулирующий эффект соединения метил(2-{[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]амино}этил)дитиокарбамат (**3**) в модели потери памяти, вызванной длительным применением скополамина. *** $p < 0,001$, сравнение с контрольной группой. $\approx p < 0,05$, $\approx\approx p < 0,01$, сравнение с группой ESC. Однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием Тьюки.

Фиг. 10. Нейропротекторное действие соединения метил(2-{[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]амино}этил)дитиокарбамат (**3**) на эксцитотоксическое повреждение, индуцированное глутаматом, в клеточной линии SH-SY5Y. Клетки SH-SY5Y обрабатывали различными концентрациями соединения **3** (1,8-60 мкмоль/л) в течение 24 часов, затем среду заменяли новой средой, снова содержащей соединение и глутамат 60 мкмоль/л. Контроли: необработанные клетки (NT) и глутамат (Glut). Жизнеспособность определяли с помощью МТТ-теста. Метил (2-{[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]амино}этил)дитиокарбамат значительно снижал гибель клеток, вызванную глутаматом в концентрациях (7,5 и 15 мкмоль/л). Каждый

столбец представляет собой среднее \pm SEM, $n = 3$. Статистически значимой разницей считали $p < 0,05$.

Фиг. 11. Нейропротекторное действие соединения метил(2-{[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]амино}этил)дитиокарбамат (**3**) на судороги, вызванные интрацеребральным введением каиновой кислоты, выраженное в конечных баллах (0-120 минут) различных групп животных. Столбцы представляют собой среднее значение \pm SEM, $n = 7$ на группу. * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,001$. Сравнение с контрольной группой. Однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием Тьюки. Статистически значимой разницей считали значение $p < 0,05$.

Фиг. 12. Профили высвобождения Состав 1 в таблетках соединений: (N-[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]- β -аланин (**1**) и метил(2-{[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]амино}этил)дитиокарбамат (**3**), без ферментов при pH 1,2, при pH 7,5 и изменении от pH 1,2 до 7,5, в течение 18 часов.

Фиг. 13. Профили высвобождения Состав 2 в таблетках соединений: 6-{[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]амино}гексановая кислота (**2**) и метил(2-{[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]амино}этил)дитиокарбамат (**3**), без ферментов при pH 1,2, при pH 7,5 и изменении от pH 1,2 до 7,5, в течение 18 часов.

Фиг. 14. Профили высвобождения Состав 3 в таблетках соединения метил(2-{[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]амино}этил)дитиокарбамат (**3**), без ферментов при pH 1,2, при pH 7,5 и изменении от pH 1,2 до 7,5, в течение 18 часов.

Фиг. 15. Влияние введения однократных интраназальных доз (7,2 мг/кг) соединения **3** на амнезию, вызванную однократным введением скополамина (1,5 мг/кг, в/бр.) в тесте в Y-образном лабиринте. Столбцы представляют собой среднее значение \pm SEM времени, проведенного в новом рукаве, $n = 10$ животных/группа. * ** $p < 0,001$; сравнение с контрольной группой, получавшей физиологический раствор, и контрольной группой, получавшей растворитель. $\approx p < 0,01$ Сравнение с группой ESC. Простой ANOVA с последующим апостериорным критерием Тьюки.

Фиг. 16. Эффект введения однократных доз интраназальным путем (74 мкг/кг) соединения **3** на амнезию, вызванную однократным введением скополамина (1,5 мг/кг., внутривенно) в тесте распознавания объектов. Столбцы представляют собой среднее значение \pm SEM индекса распознавания, $n = 10$ животных/группа. * ** $p < 0,001$; сравнение с контрольной группой, получавшей физиологический раствор, и

контрольной группой, получавшей растворитель. $\approx \approx p < 0,001$ Сравнение с группой скополамина. Простой ANOVA с последующим апостериорным критерием Тьюки.

Примеры приведены ниже для трех соединений формулы I, которые никоим образом не должны быть истолкованы как ограничивающие настоящее изобретение.

Пример 1. Оценка влияния соединения формулы 1 (N-[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]-β-аланин (1**)) на мембранный потенциал, набухание и продукцию активных форм кислорода в митохондриях, выделенных из печени крыс.**

Выделение митохондрий крыс: Митохондрии выделяли классическим методом дифференциального центрифугирования из печени самцов крыс линии Wistar (*Mirandola SR, et al., in J Neurosci Res 2010; 88: 630–39*).

Процедуры инкубации: Митохондрии активировали с помощью 5 ммоль/л сукцината калия (плюс 2,5 мкмоль/л ротенона) в стандартной инкубационной среде, содержащей 125 ммоль/л сахарозы, 65 ммоль/л KCl и 10 ммоль/л HEPES-KOH, pH 7,4, при 30 °C.

Анализ митохондрий

Митохондриальный мембранный потенциал и АФК определяли с помощью спектрофотометрии, используя в качестве флуоресцентных зондов, соответственно, сафранин (10 мкмоль/л) (*Zanotti A., and Azzone GF in Archives of Biochemistry and Biophysics 1980, 201 (1), 255-265*) и Amplex Red (Molecular Probes, OR, Eugene) в присутствии пероксидазы хрена (1 МЕ/мл) (*Votyakova and Reynolds, in J Neurochem. 2001, 79 (2), 266-77*). Измерения проводили на флуоресцентном спектрофотометре Hitachi модели F-4500 (Токио, Япония) при λ_{exc} 495 / λ_{em} 586 нм (сафранин) и при λ_{exc} 563 / λ_{em} 587 нм (Amplex Red). Эти эксперименты проводили в присутствии 0,1 ммоль/л EGTA, а оцениваемое соединение представляло собой N-[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]-β-аланин (**1**) в диапазоне концентраций от 0,1 до 100 мкмоль/л. Набухание митохондрий оценивали спектрофотометрически по снижению оптической плотности при 540 нм с использованием спектрофотометра Hitachi, модель U-2910 (Япония).

Анализ данных Во всех случаях нормальное распределение и однородность дисперсий данных оценивали с использованием критериев Колмогорова-Смирнова и

Левена, соответственно. Сравнение переменных функциональности митохондрий проводили с помощью t-критерия Стьюдента. Для анализа данных работали с уровнем значимости 0,05 и использовали программу Statistica 8.0 (StatSoft Ink). Графическое представление результатов было выполнено в программе GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Калифорния, США).

Пример 2. Оценка антихолинергического модулирующего эффекта соединения метил(2-[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]амино}этил)дитиокарбамат (3) в модели потери памяти, вызванной однократным применением скополамина.

Животные

Использовали молодых самцов мышей OF-1 (20-25 г), предоставленных Национальным центром по разведению лабораторных животных (CENPALAB, Куба). Перед экспериментом животных адаптировали в течение семи дней к лабораторным условиям (контролируемая температура $25 \pm 2^\circ\text{C}$, относительная влажность $60 \pm 10\%$ и циклы свет/темнота 12 ч). В течение этого периода и во время эксперимента животные получали воду *ad libitum* и стандартный корм для грызунов, поставляемый CENPALAB. Все процедуры проводились в соответствии с руководящими принципами Европейской комиссии по использованию лабораторных животных и уходу за ними и были одобрены Комитетом по уходу за исследовательскими животными. Использовали минимальное количество животных и продолжительность наблюдений, необходимые для получения непротиворечивых данных.

Дизайн эксперимента

В конце адаптационного периода животных случайным образом распределяли по массе тела на 5 экспериментальных групп по 12 животных в группе. Гидробромгидрат скополамина (ESC, Sigma Aldrich) использовали для индуцирования когнитивного дефицита, для этого растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривентриально (в/вр) в дозе 1,5 мг/кг за 30 минут до испытания (*Miranda HF et al. in. J. Biomed. Sci., 2014 21 (1): 62-62*). Используемые дозы соединения **3** составляли 0,1, 1, 10 и 20 мг/кг массы тела. Готовили состав, содержащий соединение, с использованием карбоксиметилцеллюлозы (СМС). Схема введения была разработана следующим образом:

Группа 1 (отрицательный контроль) с нормальной когнитивной функцией. Два введения с интервалом 30 минут с носителем (5% СМС) пероральным путем и физиологическим раствором внутрибрюшинным путем, соответственно.

2 группа (положительный контроль) с когнитивной дисфункцией. Два введения с интервалом 30 минут, первое с носителем (5% СМС), второе с ESC 1 мг/кг.

Группы 3, 4, 5 и 6, получавшие **3** (0,1, 1, 10 и 20 мг/кг). Два введения с интервалом 30 минут, первое с соединением **3** в дозе, соответствующей каждой группе, второе с ESC 1 мг/кг. Поведенческая оценка проводилась через 30 минут после этого второго введения.

10

Поведенческие тесты

Y-образный лабиринт

Изучение кратковременной пространственной памяти проводилось путем изучения новых пространственных предпочтений с использованием поведенческой парадигмы «Y-образный лабиринт» (40 см в длину x 9 см в ширину x 16 см в высоту) с внелабиринтными дорожками вокруг лабиринта. Испытание состояло из двух тестов, разделенных интервалом в 2 часа. В первом тренировочном тесте (знакомство) мышей помещали в центр лабиринта и обращали мордочкой к концу одного из рукавов, выбор которого был случайным. Затем мышам позволяли обследовать лабиринт в течение 10 минут, при этом один из рукавов был закрыт (новый рукав). В конце этого теста мышей возвращали в исходную клетку до второго теста (распознавание), во время которого они могли свободно обследовать все три рукава лабиринта в течение 5 минут. Общее время пребывания (обследования) в каждом рукаве измеряли и анализировали по видеозаписям. Вход в рукав определяли как вход четырех ног животного в указанный рукав. Время пребывания (сек) в каждом рукаве во время теста распознавания изученной ранее задачи использовалось для статистического анализа. Лабиринт очищали 70% этанолом между циклами. Всех мышей транспортировали в комнату поведенческого тестирования в их постоянных клетках по меньшей мере за 1 день до тестирования. Эксперименты проводили с 8:00 до 12:30.

30

Водный лабиринт Морриса (ВЛМ).

Опыт проводился в течение двух дней; в первый день проводили обучение, а во второй день тестирование. Всех мышей транспортировали в комнату для поведенческого тестирования в их постоянных клетках по меньшей мере за 1 день до тестирования, и эксперименты проводили с 8:00 до 12:30. Животных обучали в соответствии с критериями в ряде тестов с видимой платформой в день 1 (D1) в бассейне диаметром 120 см и глубиной 51 см с температурой воды 24 ± 2 °C, где на стене в каждом квадранте были размещены высококонтрастные визуальные знаки, а также внешние знаки в комнате. Этап обучения включал четыре теста с видимой платформой (V1-V4), и последний тест рассматривался как базальная латентность спасения после привыкания. Это было обозначено D1V4 (день 1, видимая тестовая платформа 4). Обучение животных распределяли по времени таким образом, чтобы для каждой мыши интервалы между тестами были одинаковыми, то есть 30 ± 10 минут между каждым тестом, и тест начинали каждый раз с разных положений лабиринта, выбранных случайным образом. Чтобы сделать платформу видимой, ее идентифицировали при помощи объекта, высококонтрастного по отношению к дну резервуара. Животных, которые не смогли спастись из воды в течение 1 минуты, вручную направляли на платформу и оставляли на ней в течение 5-10 секунд перед тем, как вынуть из резервуара. Затем мышей обсушивали и помещали в их клетки, освещенные лампами накаливания, чтобы избежать переохлаждения. Через 24 часа после последнего теста на видимой платформе (D2) животных оценивали в серии из трех тестов со скрытой платформой (T1-T3). Испытания проводили каждые 30 минут, и продолжительность каждого испытания составляла максимум 1 минуту. Для всех испытаний платформа оставалась на том же месте.

Статистический анализ

Все данные выражены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Данные о водном лабиринте Морриса анализировали двумя способами. Латентности спасения в фазе обучения с видимой платформой анализировали с использованием двухфакторного ANOVA (лечение \times испытание). Для исследования долговременной памяти были использованы последнее значение латентности спасения в фазе обучения с видимой платформой (D1V4) и первое значение теста со скрытой платформой, выполненного через 24 часа (D2T1). Мыши с неповрежденной долговременной памятью должны быстро достичь скрытой платформы в первом тесте. Была получена система подсчета баллов для разницы D2T1-D1V4 и

соотношения D2T1/D1V4. Оценка D2T1-D1V4 для успешного субъекта должна быть близка к 0, а оценка D2T1/D1V4 - примерно 1 или меньше. Более высокие значения указывают на более длительную латентность спасения через 24 ч, что подразумевает дефицит пространственного ориентирования животных. Это сравнение было
 5 проведено при помощи однофакторного дисперсионного анализа с последующим апостериорным критерием Тьюки. Анализ данных Y-подобного лабиринта также проводили с помощью того же теста, что и выше. Статистически значимой разницей считали $p < 0,05$. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPadPrism версии 5 (GraphPad Software, Inc., Сан-Диего, США).

10

Пример 3. Оценка антихолинергического модулирующего эффекта соединения метил(2-{4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил}амино}этил)дитиокарбамата (3) в модели потери памяти, вызванной однократным применением скополамина, через активность AChE в гомогенатах цельного мозга.

15

Активность AChE в головном мозге мышей определяли в соответствии с колориметрическим анализом Ellman et al. (*Ellman GL, et al. B Biochem Pharmacol, 1961; 7: 88-95*), адаптированным для определения активности ферментов в супернатанте гомогената мозга. Вкратце процедура выглядела следующим образом: в
 20 конце поведенческих экспериментов мышей анестезировали и обезглавливали, затем быстро удаляли мозг, который помещали на ледяную пластину. Мозг взвешивали и гомогенизировали (1/10, масс./об.) в холодном 10 ммоль/л буфере Tris-HCl, pH 7,2, содержащем 160 ммоль/л сахарозы. Гомогенаты центрифугировали при 10000 XG в течение 10 минут при 4°C, и полученные прозрачные супернатанты использовали в
 25 качестве источников ферментов, которые аликвотировали ($n = 10$ на группу) и хранили при -20°C. Анализ проводили на 96-луночных микротитрационных планшетах с использованием реагента Элмана (DTNB 10 ммоль/л), 50 мкл гомогената и 10 мкл ацетилхолина йодида (AChI, 20 ммоль/л) (конечный объем 200 мкл). Поглощение желтого гидролизата дианиона 5-тио-2-нитробензойной кислоты
 30 (молярный коэффициент экстинкции: $13\ 700\ \text{моль/л}^{-1}\ \text{см}^{-1}$) измеряли при 412 нм в течение 20 минут с интервалом в 1 минуту. Активность AChE проводили в трех повторностях и выражали в нмоль гидролизованного AChI в минуту на мг белка.

Концентрации белка определяли модифицированным методом Лоури (*Markwell MAK et al. In Anal. Biochem. 1978, 87 (1): 206-210*).

Статистический анализ

5 Все данные выражены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Сравнение значений активности холинэстеразы проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим апостериорным критерием Тьюки. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPadPrism версии 5 (GraphPad Software, Inc., Сан-Диего, США).

10

Пример 4. Оценка антихолинергического модулирующего эффекта соединения метил(2-{{4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил}амино}этил)дитиокарбамата (3**) в модели потери памяти, вызванной длительным применением скополамина.**

15

Животные:

Использовали 6 самцов мышей C57BL (20-25 г), предоставленных Национальным центром по производству лабораторных животных (СЕНPALAB, Куба). Во время эксперимента животные получали воду *ad libitum* и стандартный корм, поставляемый СЕНPALAB. Все процедуры проводились в соответствии с руководящими принципами Европейской комиссии по использованию лабораторных животных и уходу за ними и были одобрены Комитетом по уходу за исследовательскими животными. Использовали минимальное количество животных и продолжительность наблюдений, необходимые для получения непротиворечивых данных.

25

Дизайн эксперимента

В конце адаптационного периода животных случайным образом распределяли по массе тела в пять экспериментальных групп по 12 животных в каждой. Для индукции когнитивного дефицита использовали ESC (Sigma Aldrich), который растворяли в физиологическом растворе и вводили ежедневно внутривентриально (в/вр) в дозе 1,5 мг/кг утром в течение 2 недель (*Park JH, et al. in J Mol Neurosci. 2016; 59 (4): 579-589*). Соединение **3** получали в виде суспензии в 0,5% растворимом крахмале (Merck Millipore) и вводили перорально с помощью внутрижелудочной

канюли в суточной дозе 0,1, 1, 10 мг/кг массы тела (0,01 мл/кг). Экспериментальными группами были:

Группа 1 (отрицательный контроль) с нормальной когнитивной функцией. Ежедневное введение носителя: крахмал 0,5% (перорально) и физиологического раствора (в/бр) в течение двух недель.

2 группа (положительный контроль) с когнитивной дисфункцией. Ежедневное введение ESC 1,5 мг/кг в течение двух недель и растворителя (крахмал 0,5% перорально).

В группах 3, 4, 5 введение соединения 3 начинали за четыре дня до начала введения ESC. Животным в каждой группе вводили 3 перорально в дозах 0,1, 1 и 10 мг/кг, соответственно. Ежедневное введение ESC (1,5 мг/кг) проводили в течение двух недель. По завершении этого лечения была начата оценка поведения.

Водный лабиринт Морриса (ВЛМ): Аналогично примеру 2, двухдневный тест в ВЛМ использовали для определения долгосрочной пространственной памяти. В этом случае, поскольку использовали резервуар диаметром 1,35 м, в течение периода обучения было проведено шесть испытаний (от D1V1 до D1V6) и три испытания через 24 часа (от D2T1 до D2T3). Таким образом, долгосрочная пространственная память определялась коэффициентом значений латентности спасения D2T1/ D1V6.

20 Статистический анализ

Для анализа данных долговременной памяти была проведена статистическая процедура, аналогичная процедуре, проведенной для неограничивающего Примера 2, с помощью программы GraphPadPrism версии 5 (GraphPad Software, Inc., Сан-Диего, США).

25

Пример 5. Нейропротекторное воздействие соединения метил(2-{{4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил}амино}этил)дитиокарбамат (3) на эксцитотоксическое повреждение, индуцированное глутаматом, в клеточной линии SH-SY5Y.

30 Соединение 3 растворяли в ДМСО при концентрации 100 ммоль/л, а затем аликвотировали и хранили при -20 °С. Среду RPMI 1640 (1X) + GlutaMax (Gibco Laboratorios Life Technologies, Inc.; Роквилл, Мэриленд, США), содержащую буфер HEPES (25 ммоль/л) и L-глутамин (2 ммоль/л), дополняли 10 % фетальной бычьей

сывороткой (FBS), 1% пируватом натрия (100 ммоль/л), 1% смесью антибиотиков пенициллин (10 000 ЕД/мл)-стрептомицин (10 мг/мл), 1% гентамицин (10 мг/мл), трипсин-ЭДТА (0,25%) и фосфатно-солевым буфером (1X DPBS). 3-(4,5-диметил-2-тиазоил)-2,5-дифенилтетразол (МТТ) бромид, диметилсульфоксид (ДМСО) и глутаминовая кислота были получены от Sigma Chemical Co. (Сент-Луис, Миссури, США).

Клеточная культура: Клетки нейробластомы человека SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) выращивали в колбах T-75 см² с культуральной средой RPMI 1640, содержащей буфер HEPES (25 ммоль/л) и L-глутамин (2 ммоль/л) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), предварительно инактивированной нагреванием, 1 ммоль/л пирувата натрия, смеси антибиотиков бензилпенициллина (100 Ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Кроме того, добавляли гентамицин (100 мкг/мл), и считали это полной средой (CM). Культуру инкубировали во влажной атмосфере 5% CO₂, 95% воздуха, и при температуре 37°C. Среду меняли каждые два дня, и клетки субкультивировали каждые пять дней трипсинизацией при плотности 4-5 x 10⁶ клеток/75 см² в колбе для экспериментальной работы и/или пересева клеток нового поколения для последующего использования.

Цитотоксичность метил(2-{[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]амино}этил)дитиокарбамата (3): Клетки нейробластомы человека SH-SY5Y культивировали в RPMI 1640 (CM), инкубировали при 37°C в атмосфере CO₂ 5% и воздуха 95%. Когда они достигли конfluence между 80-90%, их трипсинизировали 0,25% смесью трипсина с ЭДТА (1 мл/25 см²) в течение 2-3 минут для отделения клеток. Затем эту суспензию нейтрализовывали тем же объемом МС. Затем их центрифугировали при 112 X G в течение 8 минут, супернатант удаляли декантацией и осадок ресуспендировали в 1 мл полной среды для подсчета в гемоцитометре.

Когда стала известна плотность клеток, их высевали в 96-луночные культуральные планшеты (200 мкл в каждую лунку) в концентрации 80 × 10⁴ клеток/лунку, через 24 часа инкубации 100 мкл супернатанта удаляли из каждой лунки и затем добавляли 100 мкл соединения **3** получали в CM в различных концентрациях (0,93, 1,87, 3,75, 7,5, 15, 30, 60 и 100 мкмоль/л) и снова инкубированного в течение 24 часов в условиях 5% CO₂, 95% воздуха при 37°C. По

истечении времени инкубации жизнеспособность клеток определяли с помощью анализа МТТ.

Нейропротекторное действие метил(2-{[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]амино}этил)дитиокарбамата против глутамат-индуцированной гибели нейронов: Для оценки нейропротекторного действия соединения **3** клеточную линию SH-SY5Y культивировали до конfluence между 80-90%, клетки трипсинизировали и затем подсчитывали в гемоцитометре. Когда стала известна плотность клеток, их высевали в 96-луночный культуральный планшет (200 мкл в каждую лунку) в концентрации 80×10^4 клеток/лунку. Затем после 24 часов инкубации при 37°C во влажной среде с 5% CO₂ в каждую лунку выводили 100 мкл надосадочной жидкости и добавляли 100 мкл соединения **3**, полученного в полной среде, в различных концентрациях (0,93; 1,87; 3,75; 7,5; 15; 30; 60 мкмоль/л) и снова инкубировали в течение 24 часов в условиях 5% CO₂, 95% воздуха при 37°C. По истечении времени инкубации 100 мкл супернатанта выводили в каждую лунку и добавляли 100 мкл свежеприготовленной смеси соединения **3** в тех же концентрациях, что и в предыдущий день, и 60 ммоль/л свежеприготовленной глутаминовой кислоты в полной среде, и снова инкубировали в течение 24 часов в условиях CO₂ 5%, воздух 95% при 37°C. После истечения времени инкубации жизнеспособность клеток определяли с помощью анализа МТТ.

Жизнеспособность клеток. Анализы МТТ: Жизнеспособность клеток измеряли с помощью продуктов формазанового синего, полученных в результате ферментативной трансформации МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Нтетразолиябромид) митохондриальными дегидрогеназами, которые активны только в жизнеспособных клетках. Анализ проводили в 96-луночных планшетах, клетки подвергали воздействию глутамата в качестве стрессора, соединения **3** или обоех в разное время и в разных концентрациях. После обработки различными способами добавляли МТТ (свежеприготовленный при 5 мг/мл в МС), добавляли 50 мкл/лунку и инкубировали в течение 4 часов в атмосфере 5% CO₂, 95% воздуха при 37°C. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл изобутилового спирта (SDS 10%, 2-бутанол 50%, 0,25 мкл HCl 2 ммоль/л) для солюбилизации кристаллов формазана, и оптическую плотность каждой лунки измеряли до 30 минут при 570 нм в

спектрофотометре Clariostar (BMG Labtech). Коррекцию значений ОП проводили при длине волны 690 нм. Для каждого эксперимента проводили три повторения. Результаты выражали как процент оптической плотности каждого экспериментального варианта по отношению к оптической плотности, полученной для группы клеток, не обработанных глутаматом.

Пример 6. Нейропротекторное действие соединения метил(2-{{4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил}амино}этил)дитиокарбамат (3) на судороги, индуцированные интрацеребральным введением каиновой кислоты

10 Экспериментальные животные и группы.

Использовали молодых самцов мышей OF-1 (20-25 г), предоставленных Национальным центром по разведению лабораторных животных (СЕНPALAB, Куба). Условия адаптации и содержания животных перед проведением эксперимента были аналогичны тем, которые были разработаны для неограничивающего Примера 2. Мыши были разделены на 5 экспериментальных групп (группы по 7 животных), распределенных в: контрольную группу (PBS 2 мкл, интрацеребрально), контрольную группу судорог (КА 2 мкл, интрацеребрально) и три группы, получавшие перорально желудочную канюляцию соединением **3** в дозах 1, 5, 50 мг/кг (0,01 мл/кг) и КА 2 мкл, интрацеребрально. Соединение **3** получали в виде суспензии в 5% носителе карбоксиметилцеллюлозе (СМС). Введение **3** и носителя в контрольных группах проводили за 1 час до интрацеребральной инъекции КА. Всем животным вводили КА (Sigma Aldrich), приготовленный в PBS, в концентрации 0,5 мг/мл.

Интрацеребральное введение КА

25 Для интрацеребрального введения КА мышей анестезировали при помощи 685,71 мг/кг хлоралгидратом внутривентриально и помещали на двойной манипулятор. Обнажали стереотаксический каркас и череп. Стереотаксические координаты для бокового желудочка были точно измерены как: передне-задняя -0,8 ммоль/л, боковая ± 1,0 ммоль/л и дорсовентральная -3,0 ммоль/л относительно брегмы и вентральной 30 твердой мозговой оболочки с зубчатым стержнем при 0 ммоль/л. В черепе выполняли трепанационное отверстие при помощи автоматического микроперфоратора, прикрепленного к манипулятору стереотаксического аппарата. Через отверстие вводили шприц Hamilton® 10 мкл 28 калибра, прикрепленный к другому

манипулятору стереотаксического аппарата, и поршень шприца вручную опускали в правый боковой желудочек, освобождая его от его содержимого в течение 3 минут.

Наблюдение за поведением

5 Оценку судорог проводили по шкале Расина (R.J. Racine, in Clin. Neurophysiol. 1972, 32 281–294) с использованием следующих критериев измерения: (1) неподвижность, движения пасти и лицевых мышц; (2) разгибание передних конечностей и/или разгибание хвоста, ригидная поза; (3) повторяющиеся движения, покачивание головой; (4) подъем и падение; (5) постоянные подъемы и падения; (6)
10 тяжелые тонико-клонические судороги; (7) смерть. За каждым животным наблюдали два независимых наблюдателя, и в течение 2 часов поведение оценивали количественно. Для статистического анализа использовали сумму накопленных баллов для каждого животного в течение этого временного интервала.

Статистический анализ

15 Все данные выражены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM) и проанализированы с использованием однофакторного дисперсионного анализа с последующим апостериорным критерием Тьюки. Для сравнения между группами использовали среднее значение накопленного балла для каждой экспериментальной группы через 2 ч после введения КА интрацеребрально. Статистически значимой
20 разницей считали $p < 0,05$. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPadPrism версии 5 (GraphPad Software, Inc., Сан-Диего, США).

**Пример 7. Формула 1 для изготовления таблеток активных агентов N-[4-
25 (1-нафтиламино) -4-оксобутаноил]- β -аланин (1) и метил(2-{{4-(1-нафтиламино)-4-
оксобутаноил}амино}этил)дитиокарбамат (3) с
гидроксипропилметилцеллюлозой (HPMC).**

30 Все компоненты взвешивали в соответствии с количествами, указанными в формуле. Активный ингредиент и полимерную матрицу просеивали через сито № 40 и затем перемешивали в течение пяти минут при 30 об/мин. Затем каждые 15 минут добавляли остальные компоненты со скоростью 50 об/мин до получения однородной смеси. Затем смесь сжимали на высокоскоростной ротационной машине, используя плоские, скошенные и нещелевые матрицы.

Полученные таблетки были гладкими и однородными, с отклонением массы, составляющим менее 1%, имели соответствующую твердость ($4,51 \pm 0,37$ кгс), хорошую стойкость к истиранию, достаточное время распада и содержание активного агента от 90 до 110%.

- 5 Статистическую обработку профилей высвобождения активного агента из исследуемых гидрофильных матриц проводили с применением программного обеспечения Origin 5.0 с уровнем доверительной вероятности 95%.

Производственная формула 1 на таблетку:

Компоненты	Вес (мг)	%
Активный агент	10	10
НРМС	25	25
Лактозы моногидрат	9	9
Крахмал	21	21
Микрокристаллическая целлюлоза	32	32
Диоксид кремния	1,5	1,5
Стеарат магния	1,5	1,5
Масса таблетки (мг)	100	100

- 10 **Пример 8. Формула 2 для изготовления таблеток активных агентов N-[4-(1-нафтиламино) -4-оксобутаноил]-β-аланин (1) и метил(2-{{4-(1-нафтиламино) -4-оксобутаноил}амино}этил)дитиокарбамат (3) с гидроксипропилцеллюлозой (НРС).**

- 15 Все компоненты взвешивали в соответствии с количествами, указанными в формуле. Активный агент и полимерную матрицу просеивали через сито № 40 и затем перемешивали в течение 5 минут при 30 об/мин. Затем каждые 15 минут добавляли остальные компоненты со скоростью 50 об/мин до получения однородной смеси. Затем смесь сжимали на высокоскоростной ротационной машине, используя плоские, скошенные и нецелевые матрицы.

- 20 Полученные таблетки были гладкими и однородными, с отклонением массы, составляющим менее 1%, имели соответствующую твердость ($4,51 \pm 0,37$ кгс), хорошую стойкость к истиранию, достаточное время распада и содержание активного агента от 90 до 110%.

Статистическую обработку профилей высвобождения активного агента из исследуемых гидрофильных матриц проводили с применением программного обеспечения Origin 5.0 с уровнем доверительной вероятности 95%.

Производственная формула 2 на таблетку:

Компоненты	Вес (мг)	%
Активный агент	10	10
Гидроксипропилцеллюлоза	30	30
Лактозы моногидрат	8	8
Крахмал	20	20
Микрокристаллическая	30	30
Диоксид кремния	1	1
Стеарат магния	1	1
Масса таблетки (мг)	100	100

5

Пример 9. Формула 3 для изготовления таблеток активного агента метил(2-{{4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил}амино}этил)дитиокарбамат (3) с EUDRAGIT и лактозой.

Все компоненты взвешивали в соответствии с количествами, указанными в формуле. Активный агент и полимерную матрицу просеивали через сито № 20 и затем перемешивали в течение 5 минут при 30 об/мин. Затем каждые 15 минут добавляли остальные компоненты со скоростью 50 об/мин до получения однородной смеси. Затем смесь сжимали на высокоскоростной ротационной машине, используя плоские, скошенные и нещелевые матрицы.

Полученные таблетки были гладкими и однородными, изменение массы составляло менее 1%, имели адекватную твердость ($5,01 \pm 0,68$ кгс), хорошую стойкость к истиранию, адекватное время распадаемости, а содержание активного агента составляло от 90 до 110%.

Статистическую обработку профилей высвобождения активного агента из исследуемых гидрофильных матриц проводили с применением программного обеспечения Origin 5.0 с уровнем доверительной вероятности 95%.

Производственная формула 3 на таблетку:

Компоненты	Вес (мг)	%
Активный агент	10	10

EUDRAGIT RS PO	39	39
Лактозы моногидрат	40	40
Микрокристаллическая целлюлоза	9	9
Диоксид кремния	1	1
Стеарат магния	1	1
Масса таблетки (мг)	100	

Пример 10. Состав метил(2-{{4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил}амино}этил)дитиокарбамата (3) для назального введения

5 Раствор **А**: Соединение **3** солюбилизировали в ПЭГ 400, токофероле и глицерине.

Раствор **В**: НРМС ресуспендировали в 40% воды до полного растворения при перемешивании и нагревании (80 °С).

Раствор **С**: В 60% воды растворяли хлорид бензалкония, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaCl , ЭДТА и Tween 80. Проводили проверку, что pH поддерживается на уровне 6,3.

10 Затем растворы **В** и **С** объединяли и перемешивали с получением гомогенного раствора. Затем к этому раствору медленно добавляли раствор **А**, перемешивали и, наконец, фильтровали через мембрану 0,2 мкмоль/л.

Компоненты	Концентрация (мг/мл)
Активный агент 3	6
ПЭГ 400	3
НРМС	5
Бензалкония хлорид	0,2
NaH_2PO_4	2
Na_2HPO_4	0,7
NaCl	7,4
Tween 80	0,25
ЭДТА	0,15
Глицерин	5
Вода	доводят до конечного объема 1 мл

Пример 11. Состав 1(N-[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]-β-аланина (1) для назального введения

Раствор **А**: Соединение **3** солюбилизировали в ПЭГ 400, токофероле и глицерине.

5 Раствор **В**: НРМС ресуспендировали в 40% воды до полного растворения при перемешивании и нагревании (80 °С).

Раствор **С**: В 60% воды растворяли хлорид бензалкония, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaCl , ЭДТА и Tween 80. Проводили проверку, что pH поддерживается на уровне 6,3.

10 Затем растворы **В** и **С** объединяли и перемешивали с получением гомогенного раствора. Затем к этому раствору медленно добавляли раствор **А**, перемешивали и, наконец, фильтровали через мембрану 0,2 мкмоль/л.

Компоненты	Концентрация (мг/мл)
Активный агент 1	6
ПЭГ 400	3
СМС	5
Бензалкония хлорид	0,2
NaH_2PO_4	2
Na_2HPO_4	0,7
NaCl	7,4
Токоферол	0,1
Tween 80	0,2
ЭДТА	0,1
Глицерин	5
Вода	доводят до конечного объема 1 мл

Пример 12. Исследования профилей растворения составов **1, **2** и **3**.**

15 В исследованиях растворения учитывался кубинский стандарт ((CECMED: Validation of Analytical Methods. Regulation No. 41. Havana: CECMED; 2007) и стандарты, представленные в Фармакопее Соединенных Штатов (в USP 36, Rockville: Mack Printing, New York 2013, p 3220- 3221).

Верифицировали массу 20 таблеток каждой партии Состава (примеры 7, 8 и 9). Все они находятся в пределах диапазонов значений массы разрешенных таблеток, для которых определяли профили высвобождения лекарственного средства выбранной матрицы, без ошибок, связанных с исходным составом.

5 Средства для определения профилей высвобождения:

Среда 1. - Смоделированная желудочная жидкость без ферментов pH $1,2 \pm 0,05$

2 г NaCl (чистый для анализа) взвешивали и растворяли в 7 мл HCl в колбе емкостью 1000 мл. Колбу доливали до метки дистиллированной водой. Значение pH раствора составляло 1,2.

10 Среда 2. - Имитация кишечной жидкости без фермента pH $7,5 \pm 0,1$

6,8 г одноосновного фосфата калия взвешивали и переносили в мерную колбу емкостью 1000 мл. Затем добавляли 250 мл воды, твердое вещество растворяли и добавляли 190 мл 0,2 н. раствора NaOH и 400 мл бидистиллированной воды. Наконец, его доводили до 1000 мл бидистиллированной водой. Значение pH раствора доводили с помощью 0,2 н. NaOH до pH $7,5 \pm 0,1$.

Процедура:

Каждую таблетку помещали в аппарат для растворения (Distek, модель Evolution 6100) с 600 мл среды-1 для растворения при $37^\circ \pm 0,5^\circ\text{C}$, перемешивали при 20 30 об/мин в течение 60 минут. Часть испытуемой среды немедленно фильтровали через фильтр 0,45 мкмоль/л через 5, 15, 30 и 60 минут после испытания.

Затем среду-1 для растворения сливали из устройства для растворения и заменяли на 600 мл среды-2 для растворения при температуре $37^\circ \pm 0,5^\circ\text{C}$, перемешивая при 30 об/мин в течение 8 дополнительных часов.

25 Образцы испытывали от 5 до 1080 минут, образцы немедленно фильтровали через фильтр 0,45 мкмоль/л в указанное время.

Значения оптической плотности испытуемых растворов в каждой среде растворения получали при максимальной определенной длине оптической плотности. Для количественной оценки полученного соединения проводили 30 спектрофотометрическую калибровочную кривую в УФ и видимой областях спектра (λ_{max}) в диапазоне концентраций от 0,025 до 0,150 мг/мл и использовали корректирующий холостой раствор (среда растворения).

Согласно анализу полученных данных используемая методология соответствует параметрам линейности ($R > 0,999$), прецизионности (воспроизводимости и повторяемости) и точности, требуемым аналитической методологией, что позволяет получать точные результаты в пределах диапазона 5 концентраций и в экспериментальных условиях, используемых в данном исследовании.

Пример 13. Оценка антихолинергического модулирующего эффекта соединения метил(2-{{4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил}амино}этил)дитиокарбамат (3), вводимого назально (Состав согласно примеру 10) в модели потери памяти, вызванной длительным применением скополамина.

Животные.

15 Использовали 6 самцов мышей C57BL (20-25 г), предоставленных Национальным центром по производству лабораторных животных (CENPALAB, Куба). Условия адаптации и содержания животных перед проведением эксперимента были аналогичны тем, которые были разработаны в неограничивающем примере 4.

Дизайн эксперимента

В конце периода адаптации животных случайным образом распределяли в соответствии с их массой тела на четыре экспериментальные группы по 10 животных в каждой: две здоровые контрольные группы, одной из которых вводили носитель интраназально (G1), а другой физиологический раствор в/бр (G2); 25 большую контрольную группу, которой вводили физиологический раствор, а затем ESC, растворенный в физиологическом растворе (1,5 мг/кг, в/бр) (G3), и группу с лечением, которой вводили соединение 3, полученные в соответствии с составом неограничивающего Примера 10, и через 15 минут вводили ESC (1,5 мг/кг, в/бр) (G4). Этот эксперимент проводили в двух экспериментальных сериях при одинаковых 30 условиях, описанных для изучения эффектов назального состава соединения 3 в двух поведенческих моделях: в Y-подобном лабиринте в модальности скрытого рукава и в модели распознавания объектов. Таким образом, было использовано в общей сложности 60 животных.

Для интраназального введения использовали ранее описанную методологию (Hanson, L.R., et al. in *J. Vis. Exp.* 2013 (74), e4440, doi: 10.3791 / 4440). Вкратце: голову мышей держали в положении лежа на спине с вытянутой шеей, а затем доминирующей рукой в автоматическую пипетку загружали 6 мкл лекарственного средства или носителя. Кончик пипетки помещали рядом с левой ноздрей и выпускали примерно 3 мкл содержимого пипетки. Через 2-3 секунды повторяли ту же операцию на той же ноздре. В конце этой операции животное держали в положении лежа на спине, и эту же процедуру повторяли в этом случае на правой ноздре. После завершения мышь помещали в свою клетку и через две минуты проводили еще одно введение в обе ноздри. С помощью этой системы животное иммобилизовали три раза и вносили общий объем 30 мкл, что эквивалентно дозе соединения 3 7,2 мг/кг веса. Через 15 минут после окончания последнего введения каждому животному вводили внутривентриально 1,5 мг/кг ESC или носителя (физиологического раствора) и через 30 минут проводили поведенческие тесты.

15

Поведенческие тесты

Y-подобный лабиринт

Изучение кратковременной пространственной памяти проводилось путем изучения новых пространственных предпочтений с использованием поведенческой парадигмы «Y-образный лабиринт» (40 см в длину x 9 см в ширину x 16 см в высоту) с дополнительными дорожками вокруг лабиринта, чтобы оценить распознавание пространственной памятью, зависящее от гиппокампа. Тест был разработан в соответствии с тем же протоколом, который описан в неограничивающем примере 2. Эксперименты проводили с 8 до 12:30.

25

Распознавание объектов

Тест распознавания объектов (ORT) представляет собой широко используемый поведенческий тест для исследования различных аспектов обучения и памяти, в частности, опознающей памяти, в моделях расстройств ЦНС у грызунов. Используемый протокол состоит из трех фаз: первой фазы привыкания (день 1), второй фазы ознакомления (день 2) и, наконец, тестовой фазы (день 3). Все фазы длились пять минут и проводились три дня подряд. На первой фазе животных помещали в коробку из оргстекла (25 см x 25 см x 25 см). Поведение животного

регистрировали с помощью видеокамеры. В первый день животные были доставлены в испытательную комнату за 30 минут до эксперимента, чтобы познакомиться с окружающей средой. Затем мышам давали свободно обследовать коробку в отсутствие предметов в течение пяти минут. На второй день каждая мышь проходила тренировочный тест, в котором два идентичных объекта размещали в двух противоположных положениях внутри коробки на одинаковом расстоянии от ближайших углов. На этой фазе мышам давали обследовать идентичные объекты в течение пяти минут, а затем возвращали животных в свои постоянные клетки. Во время тестовой фазы (день 3) животных снова помещали в ту же коробку, где перед проведением этой фазы один из двух знакомых объектов заменяли новым. Все объекты, использованные в этом тесте, были разными по форме и цвету, но идентичными по размеру. Они были прикреплены к полу коробки, чтобы предотвратить перемещение. Во избежание появления обонятельных сигналов, всю коробку и предметы всегда очищали 70% спиртом после каждого теста. Способность отличать новый объект от знакомого оценивали при помощи времени, необходимого для обследования объектов. Время обследования объекта определялось как период времени, в течение которого животное держало свой нос на расстоянии 2 см от объекта или нюхало или трогало объект. Сидение или стояние на объекте не считалось обследованием. Времена обследования анализировали вручную с помощью видеокамеры с детектором перемещения. Индекс распознавания (ID) рассчитывали следующим образом:

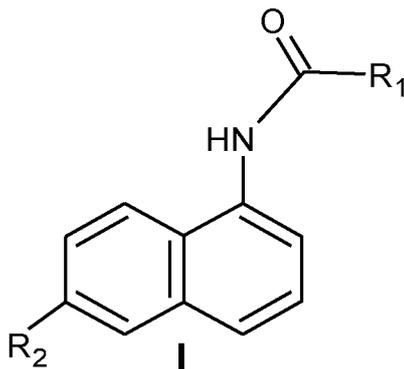
$$ID = \text{время обследования нового объекта} / \text{время обследования нового объекта} + \text{время обследования знакомого объекта}.$$

25 Статистический анализ

Все данные выражены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM) и проанализированы с использованием однофакторного дисперсионного анализа с последующим апостериорным критерием Тьюки. Статистически значимой разницей считали $p < 0,05$. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPadPrism версии 5 (GraphPad Software, Inc., Сан-Диего, США).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента направленного действия, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, для лечения болезни Альцгеймера, при этом
5 указанное соединение выбрано из группы соединений Формулы I



10 где:

R₁: -алкиленил-C(O)NH-алкиленил-R₃, -алкиленил-C(O)O-R₄;

R₃: -COOH, -OH, -SH, -NH₂, -NH-алкил-, -NH-алкиленил-NH₂, -NH-алкиленил-NH-C(O)-алкиленил-S-R₅, -NH-дитиокарбамат-алкил, соли щелочноземельных металлов - N-алкилдитиокарбамата; или фармацевтически приемлемые соли вышеупомянутых

15 групп.

R₄: сукцинимидильная группа;

R₅: -H, -C(O)-алкил, -C(O)-C₆H₅; и

R₂: -H, -алкил;

20 где термин «алкил» характеризуется тем, что он представляет собой неразветвленную или разветвленную алифатическую цепь из насыщенных атомов углерода и атомов водорода, предпочтительно метила или этила; термин «алкиленил» относится к двухвалентному аналогу неразветвленной или разветвленной алкильной группы, предпочтительно метиленилу (-CH₂-), этиленилу (-CH₂CH₂-) или пропиленилу (-CH₂CH₂CH₂-);

25 при этом указанная фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества,

и при этом указанные соединения, их соли, гидраты, энантиомеры, изомеры, метаболиты, пролекарства проходят через гематоэнцефалический барьер мозга живого животного.

5 2. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента направленного действия, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, по п. 1, отличающаяся тем, что указанная композиция взаимодействует с холинергическими клетками головного мозга, угнетает патологическую активность ацетилхолинэстеразы и восстанавливает физиологический уровень ацетилхолина.

15 3. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента направленного действия, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, по п. 1, отличающаяся тем, что указанная композиция взаимодействует с глутаматергическими клетками головного мозга, тормозит патологическую активацию NMDA и каинатных рецепторов и восстанавливает физиологическое функционирование глутаматергической системы.

20 4. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента направленного действия, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, по п. 1, отличающаяся тем, что указанная композиция взаимодействует с митохондриями головного мозга, ингибирует диссипацию потенциала митохондриальной мембраны и предотвращает набухание с поддержанием физиологических уровней активных форм кислорода.

25 5. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента направленного действия, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, по п. 1, отличающаяся тем, что указанную композицию вводят пероральным, местным, системным, внутривенным, подкожным, 30 внутрибрюшинным, внутримышечным и назальным путями или их комбинациями.

6. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента направленного действия, обладающего активностью в

отношении нескольких мишеней, по пп. 1-5, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция для перорального введения в виде таблеток содержит от 1 мг до 100 мг активного агента.

5 7. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента направленного действия, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, по пп. 1-6, отличающаяся тем, что таблетки указанной фармацевтической композиции содержат полимерную матрицу, выбранную из группы, состоящей из полиэтиленоксида,
10 гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMC), гидроксипропилцеллюлозы (HPC), карбоксиметилцеллюлозы натрия (CCNa), производных целлюлозы, Eudragit RS PO и поливинилпирролидона, или их комбинаций.

8. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве
15 терапевтического агента направленного действия, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, по п. 7, отличающаяся тем, что указанная матрица таблеток фармацевтической композиции находится в количестве от 5% масс./масс. до 80% масс./масс., предпочтительно от 10% масс./масс. до 70% масс./масс.

20 9. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента направленного действия, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, по пп. 1 и 5, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция для назального введения содержит от 0,1 мг до 25 мг активного агента на дозу.

25

10. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента направленного действия, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, по пп. 1 и 9, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция для назального введения содержит биоадгезивные
30 вспомогательные вещества в количестве от 0,05 до 6%, выбранные из группы, состоящей из гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMC), гидроксипропилцеллюлозы (HPC), метилцеллюлозы (MC), карбоксиметилцеллюлозы (CMC) и производных полиакриловой кислоты (карбола) или их комбинаций.

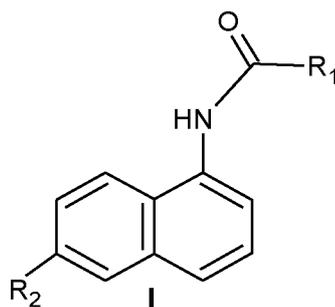
11. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента направленного действия, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, по пп. 1 и 10, отличающаяся тем, что вязкость 5 указанной фармацевтической композиции для назального введения составляет от 10 до 60 мПас.

12. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента направленного действия, обладающего активностью в 10 отношении нескольких мишеней, по пп. 1, 9 и 11, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция для назального введения содержит ПЭГ в концентрации от 0,09 до 1,8%; токоферол в концентрации от 0,08 до 1%; противомикробный консервант, выбранный из группы, состоящей из бензалкония хлорида в концентрации от 0,007 до 0,47%, динатрий ЭДТА в концентрации от 0,003 15 до 0,19% и пропилпарабена в концентрации от 0,005 до 0,04%, или их комбинаций; и увлажнитель, выбранный из группы, состоящей из глицерина в концентрации от 3,5 до 5,5% и Tween 80 в концентрации от 0,17 до 0,38%, или их комбинаций.

13. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве 20 терапевтического агента направленного действия, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней по пп. 1 и 12, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция для назального введения имеет рН от 5,5 до 6,5, предпочтительно 6,3.

25 14. Способ монотерапии болезни Альцгеймера, включающий:

а) введение фармацевтической композиция соединения Формулы I, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней:



где:

R₁: -алкиленил-C(O)NH-алкиленил-R₃, -алкиленил-C(O)O-R₄;

5 R₃: -COOH, -OH, -SH, -NH₂, -NH-алкил-, -NH-алкиленил-NH₂, -NH-алкиленил-NH-C(O)-алкиленил-S-R₅, -NH-дитиокарбамат-алкил, соли щелочноземельных металлов - N-алкилдитиокарбамата; или фармацевтически приемлемые соли вышеупомянутых групп.

R₄: сукцинимидильная группа;

10 R₅: -H, -C(O)-алкил, -C(O)-C₆H₅; и

R₂: -H, -алкил;

где термин «алкил» характеризуется тем, что он представляет собой неразветвленную или разветвленную алифатическую цепь из насыщенных атомов углерода и атомов водорода, предпочтительно метила или этила; термин «алкиленил» относится к
15 двухвалентному аналогу неразветвленной или разветвленной алкильной группы, предпочтительно метиленилу (-CH₂-), этиленилу (-CH₂CH₂-) или пропиленилу (-CH₂CH₂CH₂-);

при этом указанная фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества,

20 и где указанную фармацевтическую композицию вводят пероральным, местным, системным, внутривенным, подкожным, внутривенным, внутримышечным и назальным путями или их комбинациями,

b) указанная фармацевтическая композиция со стадии а) проходит через гематоэнцефалический барьер мозга живого животного,

25 c) приведение холинергических клеток головного мозга в контакт с соединением фармацевтической композиции стадии b) и ингибирование патологической активности ацетилхолинэстеразы с восстановлением физиологического уровня ацетилхолина,

- d) приведение глутаматергических клеток головного мозга в контакт с соединением фармацевтической композиции стадии b) и ингибирование патологической активации NMDA- и каинатных рецепторов с восстановлением физиологического функционирования глутаматергической системы, и
- 5 e) приведение митохондрий головного мозга в контакт с соединением фармацевтической композиции стадии b) с ингибированием рассеяния потенциала митохондриальной мембраны и предотвращением набухания с поддержанием физиологических уровней активных форм кислорода.
- 10 15. Способ монотерапии болезни Альцгеймера по п. 14, отличающийся тем, что указанная фармацевтическая композиция для перорального введения в виде таблеток содержит от 1 мг до 100 мг активного агента.
- 15 16. Способ монотерапии болезни Альцгеймера по п. 14 и 15, отличающийся тем, что указанные таблетки содержат полимерную матрицу, выбранную из группы: полиэтиленоксид, гидроксипропилметилцеллюлоза (HPMC), гидроксипропилцеллюлоза (HPC), карбоксиметилцеллюлоза натрия (CCNa), производные целлюлозы, Eudragit RS PO и поливинилпирролидон, или их комбинации.
- 20 17. Способ монотерапии болезни Альцгеймера по п. 14 и 16, отличающийся тем, что указанная матрица таблеток находится в количестве от 5% масс./масс. до 80% масс./масс., предпочтительно от 10% масс./масс. до 70% масс./масс.
- 25 18. Способ монотерапии болезни Альцгеймера по п. 14 и 15, отличающийся тем, что в таблетках применяются вспомогательные вещества, выбранные из группы: крахмалы, лактоза, сахароза, сорбит, маннит и другие сахара, тальк, коллоидный диоксид кремния, карбонаты, оксиды магния, фосфаты кальция, диоксид титана, повидоны, желатин, лактопротеины, цитраты, тартраты, альгинаты, декстран,
- 30 силиконовые эластомеры, полисорбаты, амилопектин, парабены, животные и растительные масла, пропиленгликоль, стерильная вода, одноатомные или многоатомные спирты, стеарат магния, стеарат кальция, стеарилфумарат натрия, лаурилсульфат натрия и глицерин или их комбинации.

19. Способ монотерапии болезни Альцгеймера по п. 14, отличающийся тем, что указанная фармацевтическая композиция для назального введения содержит от 0,1 мг до 25 мг активного агента.

5

20. Способ монотерапии болезни Альцгеймера по п. 14 и 19, отличающийся тем, что указанная фармацевтическая композиция для назального введения содержит биоадгезивные вспомогательные вещества в количестве от 0,05 до 6%, выбранные из группы: гидроксипропилметилцеллюлоза (НМРС), гидроксипропилцеллюлоза (НРС), метилцеллюлоза (МС), карбоксиметилцеллюлоза (СМС) и производные полиакриловой кислоты (карбола) или их комбинации.

10

21. Способ монотерапии болезни Альцгеймера по п. 14 и 20, отличающийся тем, что вязкость указанной фармацевтической композиции для назального введения составляет от 10 до 60 мПас.

15

22. Способ монотерапии болезни Альцгеймера по п. 14 и 19, отличающийся тем, что указанная фармацевтическая композиция для назального введения содержит ПЭГ, токоферол, противомикробный консервант, выбранный из группы, состоящей из бензалкония хлорида, динатрий ЭДТА, метилпарабена и пропилпарабена или их комбинации; и увлажнитель, выбранный из группы, состоящей из глицерина и Tween 80 или их комбинаций.

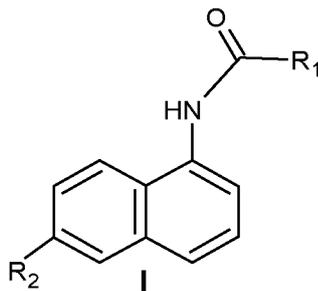
20

23. Способ монотерапии болезни Альцгеймера по п. 1 и 22, отличающийся тем, что указанная фармацевтическая композиция для назального введения имеет рН от 5,5 до 6,5, предпочтительно 6,3.

25

24. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, для применения для лечения болезни Альцгеймера, при этом указанное соединение выбрано из группы соединений Формулы I

30



где:

R₁: -алкиленил-C(O)NH-алкиленил-R₃, -алкиленил-C(O)O-R₄;

R₃: -COOH, -OH, -SH, -NH₂, -NH-алкил-, -NH-алкиленил-NH₂, -NH-алкиленил-NH-
 5 C(O)-алкиленил-S-R₅, -NH-дитиокарбамат-алкил, соли щелочноземельных металлов -
 N-алкилдитиокарбамата; или фармацевтически приемлемые соли вышеупомянутых
 групп.

R₄: сукцинимидильная группа;

R₅: -H, -C(O)-алкил, -C(O)-C₆H₅; и

10 R₂: -H, -алкил;

где термин «алкил» характеризуется тем, что он представляет собой неразветвленную
 или разветвленную алифатическую цепь из насыщенных атомов углерода и атомов
 водорода, предпочтительно метила или этила; термин «алкиленил» относится к
 двухвалентному аналогу неразветвленной или разветвленной алкильной группы,
 15 предпочтительно метиленилу (-CH₂-), этиленилу (-CH₂CH₂-) или пропиленилу (-
 CH₂CH₂CH₂-),

при этом указанная фармацевтическая композиция содержит фармацевтически
 приемлемые вспомогательные вещества,

и при этом указанные соединения, их соли, гидраты, энантимеры, изомеры,
 20 метаболиты, пролекарства пересекают гематоэнцефалический барьер мозга живого
 животного.

25 25. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве
 терапевтического агента, обладающего активностью в отношении нескольких
 мишеней, для применения для лечения болезни Альцгеймера по п. 24, отличающаяся
 тем, что указанная композиция взаимодействует с холинергическими клетками
 головного мозга, угнетает патологическую активность ацетилхолинэстеразы и
 восстанавливает физиологический уровень ацетилхолина.

26. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, для применения для лечения болезни Альцгеймера по п. 24, отличающаяся тем, что указанная композиция взаимодействует с холинергическими клетками головного мозга, угнетает патологическую активность ацетилхолинэстеразы и восстанавливает физиологический уровень ацетилхолина.

27. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, для применения для лечения болезни Альцгеймера по п. 24, отличающаяся тем, что указанная композиция взаимодействует с митохондриями головного мозга, ингибирует диссипацию потенциала митохондриальной мембраны и предотвращает набухание с поддержанием физиологических уровней активных форм кислорода.

15

28. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, для применения для лечения болезни Альцгеймера по п. 24, отличающаяся тем, что указанную композицию вводят пероральным, местным, системным, внутривенным, подкожным, внутрибрюшинным, внутримышечным и назальным путями или их комбинациями.

29. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, для применения для лечения болезни Альцгеймера по п. 24 и 28, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция для перорального введения в виде таблеток содержит от 1 мг до 100 мг активного агента.

30. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, для применения для лечения болезни Альцгеймера по п. 24 и 29, отличающаяся тем, что таблетки указанной фармацевтической композиции содержат полимерную матрицу, выбранную из группы, состоящей из полиэтиленоксида,

гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMC), гидроксипропилцеллюлозы (HPC), карбоксиметилцеллюлозы натрия (CCNa), производных целлюлозы, Eudragit RS PO и поливинилпирролидона, или их комбинаций.

5 31. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, для применения для лечения болезни Альцгеймера по п. 30, отличающаяся тем, что указанная матрица таблеток фармацевтической композиции находится в количестве от 5% масс./масс. до 80% масс./масс., предпочтительно от 10% масс./масс.
10 до 70% масс./масс.

32. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, для применения для лечения болезни Альцгеймера по п. 24 и 28,
15 отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция для назального введения содержит от 0,1 мг до 25 мг активного агента на дозу.

33. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента, обладающего активностью в отношении нескольких
20 мишеней, для применения для лечения болезни Альцгеймера по п. 24 и 32, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция для назального введения содержит биоадгезивные вспомогательные вещества в количестве от 0,05 до 6%, выбранные из группы, состоящей из гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMC), гидроксипропилцеллюлозы (HPC), метилцеллюлозы (MC), карбоксиметилцеллюлозы (СМС) и производных полиакриловой кислоты (карбола) или их комбинаций.
25

34. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, для применения для лечения болезни Альцгеймера по п. 24 и 33,
30 отличающаяся тем, что вязкость указанной фармацевтической композиции для назального введения составляет от 10 до 60 мПас.

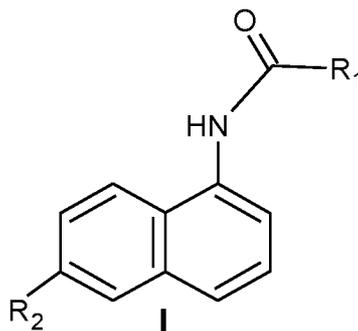
35. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, для применения для лечения болезни Альцгеймера по пп. 24, 32 и 34, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция для назального введения содержит ПЭГ в концентрации от 0,09 до 1,8%; токоферол в концентрации от 0,08 до 1%; противомикробный консервант, выбранный из группы, состоящей из бензалкония хлорида в концентрации от 0,007 до 0,47%, динатрий ЭДТА в концентрации от 0,003 до 0,19% и пропилпарабена в концентрации от 0,005 до 0,04%, или их комбинаций; и увлажнитель, выбранный из группы, состоящей из глицерина в концентрации от 3,5 до 5,5% и Tween 80 в концентрации от 0,17 до 0,38% или их комбинаций.

36. Фармацевтическая композиция соединения, которое действует в качестве терапевтического агента, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, для применения для лечения болезни Альцгеймера по п. 24 и 35, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция для назального введения имеет рН от 5,5 до 6,5, предпочтительно 6,3.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**(измененная по ст. 19 РСТ, для вступления в региональную фазу в Евразии)**

1. Фармацевтическая композиция для перорального применения с контролируемым высвобождением, содержащая:

а.- соединение формулы I, обладающее активностью в отношении нескольких мишеней:



где:

R₁: -алкиленил-C(O)NH-алкиленил-R₃, -алкиленил-C(O)O-R₄;

R₃: -COOH, -OH, -SH, -NH₂, -NH-алкил-, -NH-алкиленил-NH₂, -NH-алкиленил-NH-C(O)-алкиленил-S-R₅, -NH-дитиокарбамат-алкил, соли щелочноземельных металлов - N-алкилдитиокарбамата; или фармацевтически приемлемые соли вышеуказанных групп.

R₄: сукцинимидильная группа;

R₅: -H, -C(O)-алкил, -C(O)-C₆H₅; и

R₂: -H, -алкил,

где термин «алкил» охарактеризован как представляющий собой неразветвленную или разветвленную алифатическую цепь из насыщенных атомов углерода и атомов водорода, предпочтительно метил или этил; термин «алкиленил» относится к двухвалентному аналогу неразветвленной или разветвленной алкильной группы, предпочтительно метиленилу (-CH₂-), этиленилу (-CH₂CH₂-) или пропиленилу (-CH₂CH₂CH₂-);

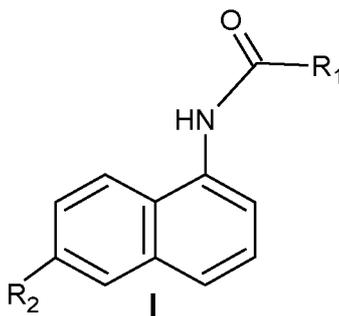
б.- полимерную матрицу, которая по существу способствует контролируемому высвобождению активного агента формулы I,

при этом указанная композиция поддерживает высвобождение активного агента в течение от 2 часов до 24 часов в среде применения, со скоростью растворения 80% в течение от 6 до 18 часов и более 90% в течение 24 часов.

2. Пероральная фармацевтическая композиция с контролируемым высвобождением по п. 1, отличающаяся тем, что таблетки содержат от 1 мг до 100 мг активного агента в полимерной матрице, которая составляет от 5% масс./масс. до 80% масс., предпочтительно от 10% масс./масс. до 70% масс./масс., и которая выбрана из группы: полиэтиленоксид, гидроксипропилметилцеллюлоза (HPMC), гидроксипропилцеллюлоза (HPC), карбоксиметилцеллюлоза натрия (CCNa), производные целлюлозы, Eudragit RS PO и поливинилпирролидон или их комбинации.

3. Фармацевтическая композиция для назального введения, содержащая:

а. - соединение формулы I, обладающее активностью в отношении нескольких мишеней:



где:

R₁: -алкиленил-C(O)NH-алкиленил-R₃, -алкиленил-C(O)O-R₄;

R₃: -COOH, -OH, -SH, -NH₂, -NH-алкил-, -NH-алкиленил-NH₂, -NH-алкиленил-NH-C(O)-алкиленил-S-R₅, -NH-дитиокарбамат-алкил, соли щелочноземельных металлов - N-алкилдитиокарбамата; или фармацевтически приемлемые соли вышеуказанных групп;

R₄: сукцинимидильная группа;

R₅: -H, -C(O)-алкил, -C(O)-C₆H₅; и

R₂: -H, -алкил,

где термин «алкил» охарактеризован как представляющий собой неразветвленную или разветвленную алифатическую цепь из насыщенных атомов углерода и атомов водорода, предпочтительно метил или этил; термин «алкиленил» относится к

двухвалентному аналогу неразветвленной или разветвленной алкильной группы, предпочтительно метиленилу (-CH₂-), этиленилу (-CH₂CH₂-) или пропиленилу (-CH₂CH₂CH₂-);

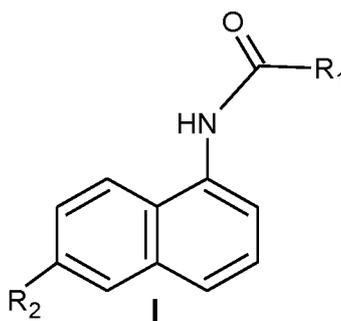
b.- биоадгезивные полимеры, которые вносят существенный вклад в увеличение времени удержания в носовой полости активного агента формулы I, при этом указанная фармацевтическая форма обеспечивает эффективный доступ лекарственного средства к нейронным путям.

4. Фармацевтическая композиция для назального введения по п. 3, содержащая на дозу от 0,1 мг до 25 мг активного агента совместно с вспомогательными веществами в количестве от 0,05 до 6%, выбранными из группы: гидроксипропилметилцеллюлоза (НМРС), гидроксипропилцеллюлоза (НРС), метилцеллюлоза (МС), карбоксиметилцеллюлоза (СМС) и производные полиакриловой кислоты (карбола), или их комбинации, и с вязкостью от 10 до 60 мПас.

5. Фармацевтическая композиция для назального введения по п. 4, содержащая ПЭГ в концентрации от 0,09 до 1,8%; СМС в концентрации от 0,05 до 0,7%, токоферол в концентрации от 0,08 до 1%; противомикробный консервант, выбранный из группы: бензалкония хлорид в концентрации от 0,007 до 0,47%, динатрий ЭДТА в концентрации от 0,003 до 0,19% и пропилпарабен в концентрации от 0,005 до 0,04%, или их комбинации; и увлажнитель, выбранный из группы: глицерин в концентрации от 3,5 до 5,5% и Tween 80 в концентрации от 0,17 до 0,38%; или их комбинации, при рН от 5,5 до 6,5, отрегулированном фосфатным буфером, предпочтительно 6,3.

6. Фармацевтическая композиция для назального введения по п. 4, содержащая ПЭГ в концентрации от 0,09 до 1,8%; СМС в концентрации от 0,05 до 0,7%, токоферол в концентрации от 0,08 до 1%; противомикробный консервант, выбранный из группы: бензалкония хлорид в концентрации от 0,007 до 0,47%, динатрий ЭДТА в концентрации от 0,003 до 0,19% и пропилпарабен в концентрации от 0,005 до 0,04%, или их комбинации; и увлажнитель, выбранный из группы: глицерин в концентрации от 3,5 до 5,5% и Tween 80 в концентрации от 0,17 до 0,38%; или их комбинации, при рН от 5,5 до 6,5, отрегулированном фосфатным буфером, предпочтительно 6,3.

7. Фармацевтическая композиция соединения, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, для применения при нарушениях холинергической, глутаматергической системы, дисбалансе митохондриальной и воспалительной окислительно-восстановительной системы, присутствующих при БА, характеризующаяся тем, что указанное соединение выбрано из группы соединений, которые имеют формулу I



где:

R₁: -алкиленил-C(O)NH-алкиленил-R₃, -алкиленил-C(O)O-R₄;

R₃: -COOH, -OH, -SH, -NH₂, -NH-алкил-, -NH-алкиленил-NH₂, -NH-алкиленил-NH-C(O)-алкиленил-S-R₅, -NH-дитиокарбамат-алкил, соли щелочноземельных металлов -N-алкилдитиокарбамата; или фармацевтически приемлемые соли вышеупомянутых групп.

R₄: сукцинимидильная группа;

R₅: -H, -C(O)-алкил, -C(O)-C₆H₅; и

R₂: -H, -алкил,

где термин «алкил» охарактеризован как представляющий собой неразветвленную или разветвленную алифатическую цепь из насыщенных атомов углерода и атомов водорода, предпочтительно метил или этил, термин «алкиленил» относится к двухвалентному аналогу неразветвленной или разветвленной алкильной группы, предпочтительно метиленилу (-CH₂-), этиленилу (-CH₂CH₂-) или пропиленилу (-CH₂CH₂CH₂-),

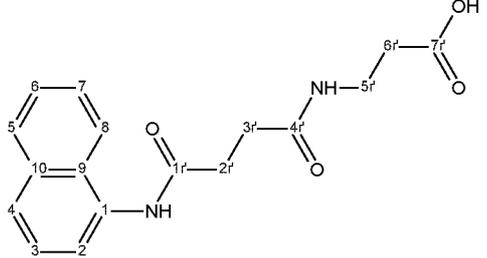
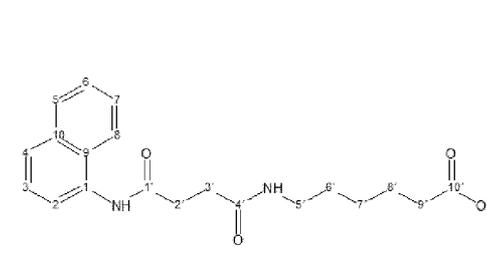
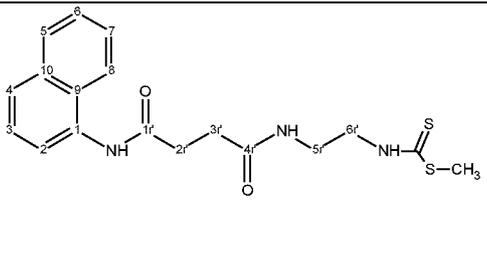
где указанная фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества.

8. Фармацевтическая композиция соединения, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, для применения при нарушениях холинергической,

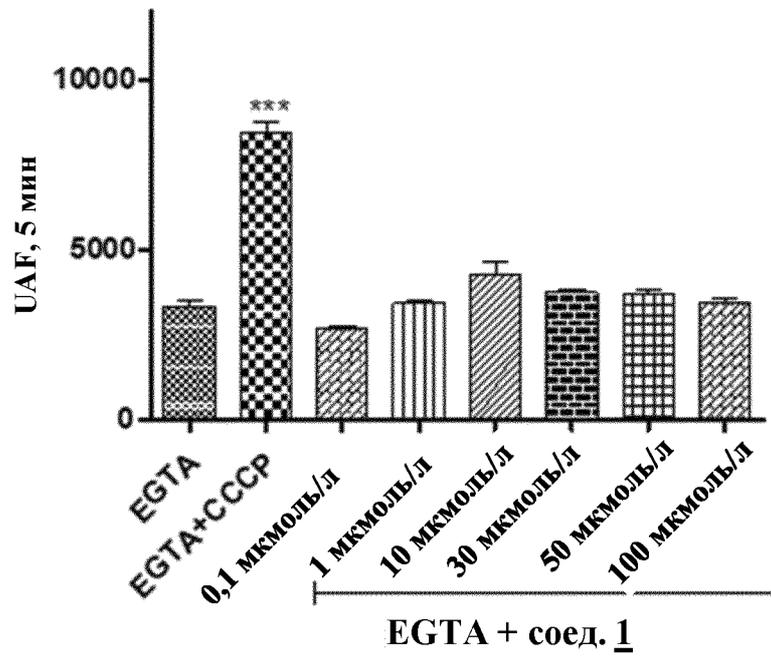
глутаматергической системы, дисбалансе митохондриальной и воспалительной окислительно-восстановительной системы, присутствующих при БА, по п. 7, отличающаяся тем, что таблетки содержат от 1 мг до 100 мг активного агента в полимерной матрице, которая составляет от 5% масс. до 80% масс., предпочтительно от 10% масс. до 70% масс., и которая выбрана из группы: полиэтиленоксид, гидроксипропилметилцеллюлоза (HPMC), гидроксипропилцеллюлоза (HPC), карбоксиметилцеллюлоза натрия (CCNa), производные целлюлозы, Eudragit RS PO и поливинилпирролидон или их комбинации.

9. Фармацевтическая композиция соединения, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, для применения при нарушениях холинергической, глутаматергической системы, дисбалансе митохондриальной и воспалительной окислительно-восстановительной системы, присутствующих при БА, по п. 7, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция для назального введения содержит от 0,1 мг на дозу до 25 мг активного агента совместно со вспомогательными веществами в количестве от 0,05 до 6%, выбранными из группы: гидроксипропилметилцеллюлоза (HPMC), гидроксипропилцеллюлоза (HPC), метилцеллюлоза (MC), карбоксиметилцеллюлоза (CMC) и производные полиакриловой кислоты (карбола), или их комбинации, и с вязкостью от 10 до 60 мПас.

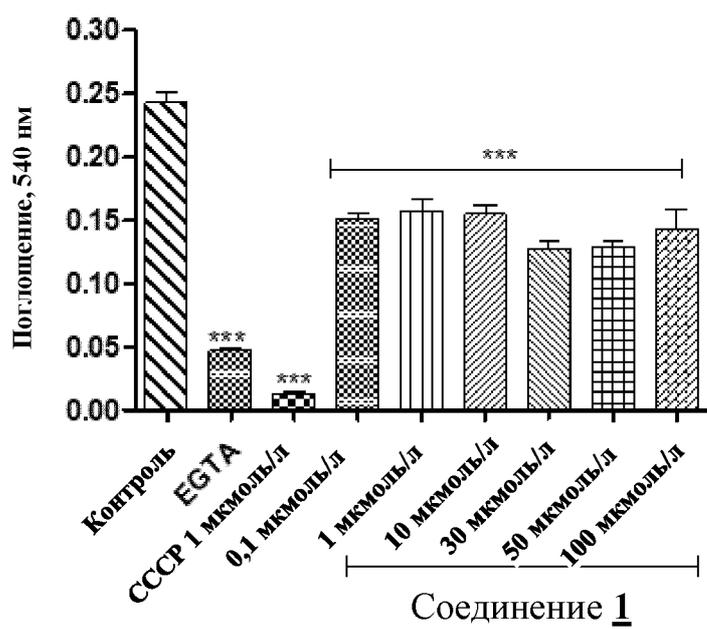
10. Фармацевтическая композиция соединения, обладающего активностью в отношении нескольких мишеней, для применения при нарушениях холинергической, глутаматергической системы, дисбалансе митохондриальной и воспалительной окислительно-восстановительной системы, присутствующих при БА, по п. 7, содержащая ПЭГ в концентрации от 0,09 до 1,8%; CMC в концентрации от 0,05 до 0,7%, токоферол в концентрации от 0,08 до 1%; противомикробный консервант, выбранный из группы: бензалкония хлорид в концентрации от 0,007 до 0,47%, динатрий ЭДТА в концентрации от 0,003 до 0,19% и пропилпарабен в концентрации от 0,005 до 0,04% или их комбинации; и увлажнитель, выбранный из группы: глицерин в концентрации от 3,5 до 5,5% и Tween 80 в концентрации от 0,17 до 0,38%; или их комбинации, при pH от 5,5 до 6,5, отрегулированном фосфатным буфером, предпочтительно 6,3.

Соединение	Структура	Физико-химические свойства
<p><i>N</i>-[4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил]-β-аланин (1)</p>		<p>МОЛЕКУЛЯРНАЯ МАССА: 314,3 г/моль. Белый кристаллический порошок.</p> <p>ХАРАКТЕРИСТИКИ КАЧЕСТВА.</p> <p>HR-TOF/MS (m/z): вычисл. для C₁₇H₁₈N₂O₄: 314,33; найдено 315,13 (M + H)⁺. Т.ф: 172,5-174,8°C. Rf: 0,1 (этилацетат).</p> <p>ВЭЖХ. Хроматографическая колонка Phenomenex C18 (150 x 4,6 /ммоль/л, 4 мкмоль/л, 80Å). Подвижная фаза: H₂O/TFA (0,1%), ACN/TFA (0,05%). Время удерживания: 25,051 мин. Чистота: 99,76%.</p>
<p>Кислота 6-{{4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил}амино} гексановая кислота (2):</p>		<p>МОЛЕКУЛЯРНАЯ МАССА: 356,3 г/моль. Белый кристаллический порошок.</p> <p>ХАРАКТЕРИСТИКИ КАЧЕСТВА.</p> <p>HR-TOF/MS (m/z): вычисл. для C₂₀H₂₄N₂O₄: 357,42 (M*H)⁺; найдено 357,18. Т.ф: 129,9-133°C. Rf: 0,6 (CHCl₃: CH₃OH, 10:3).</p> <p>ВЭЖХ. Хроматографическая колонка Phenomenex C18 (150 x 4,6 /ммоль/л, 4 мкмоль/л, 80Å). Подвижная фаза: H₂O/TFA (0,1%), ACN/TFA (0,05%). Время удерживания: 27,935 мин. Чистота: 99,19%.</p>
<p>Метил(2-{{4-(1-нафтиламино)-4-оксобутаноил}амино}этил)дитиокарбамат (3):</p>		<p>МОЛЕКУЛЯРНАЯ МАССА: 375,5 г/моль. Светло-желтый кристаллический порошок.</p> <p>ХАРАКТЕРИСТИКИ КАЧЕСТВА.</p> <p>HR-TOF/MS (m/z): вычисл. для C₁₈H₂₁N₃O₂S₂: 375,511; найдено 377,121 (M + D)⁺. Т.ф: 140-141°C. Rf: 0,3 (этилацетат).</p> <p>ВЭЖХ. Хроматографическая колонка Phenomenex C18 (150 x 4,6 /ммоль/л, 4 мкмоль/л, 80Å). Подвижная фаза: H₂O/TFA (0,1%), ACN/TFA (0,05%). Время удерживания: 31,428 мин. Чистота: 96,59%.</p>

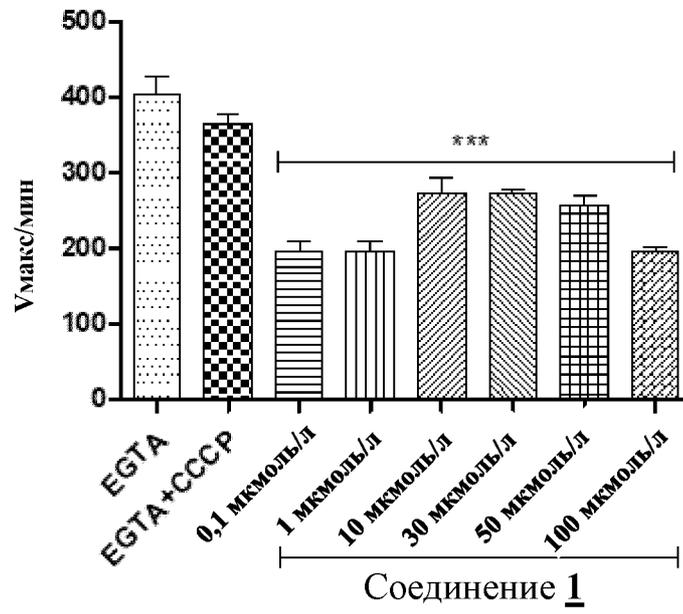
Фиг. 1



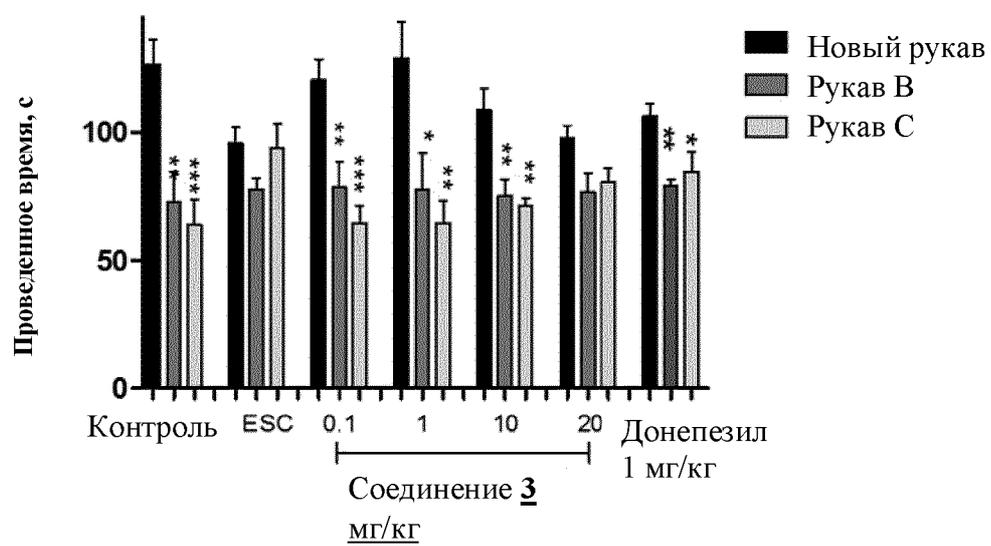
Фиг. 2



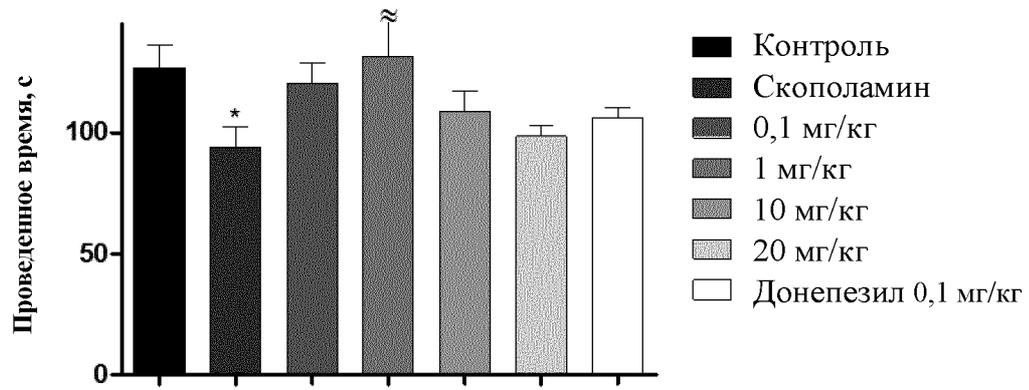
Фиг. 3



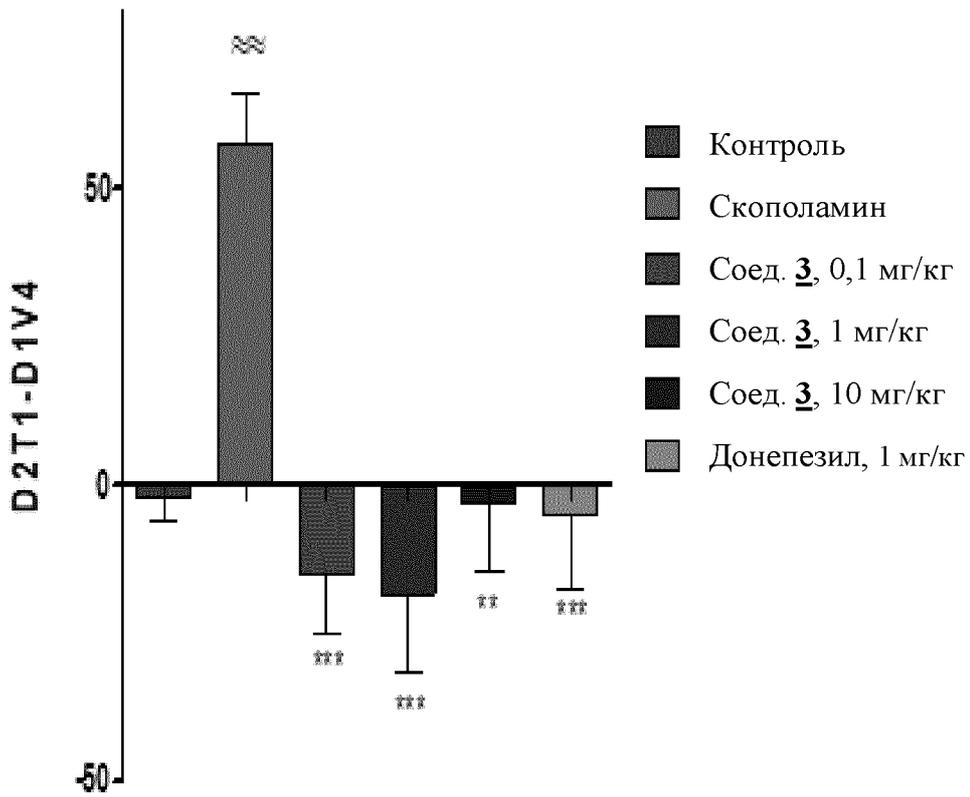
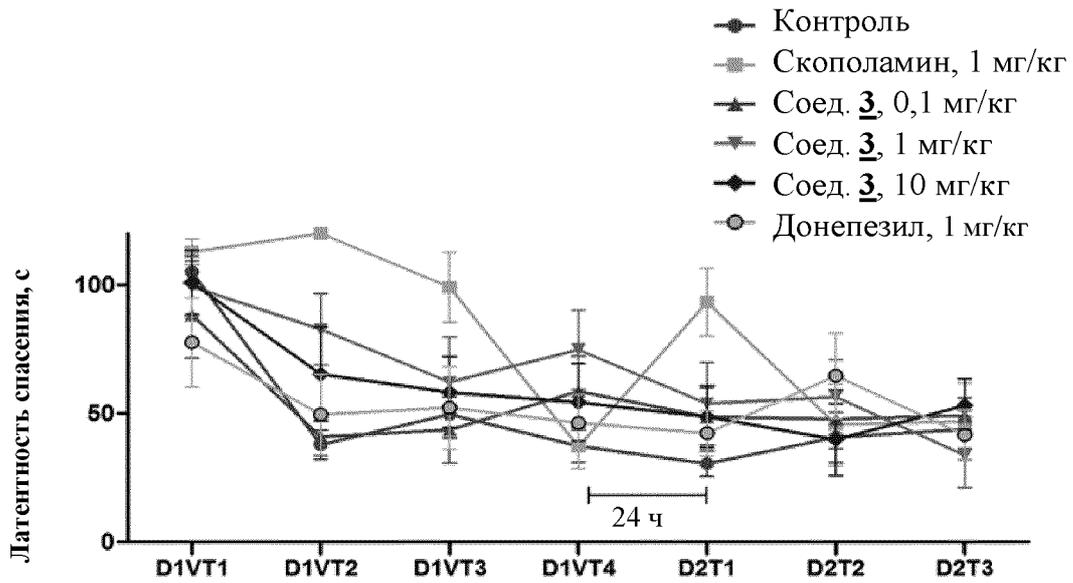
Фиг. 4



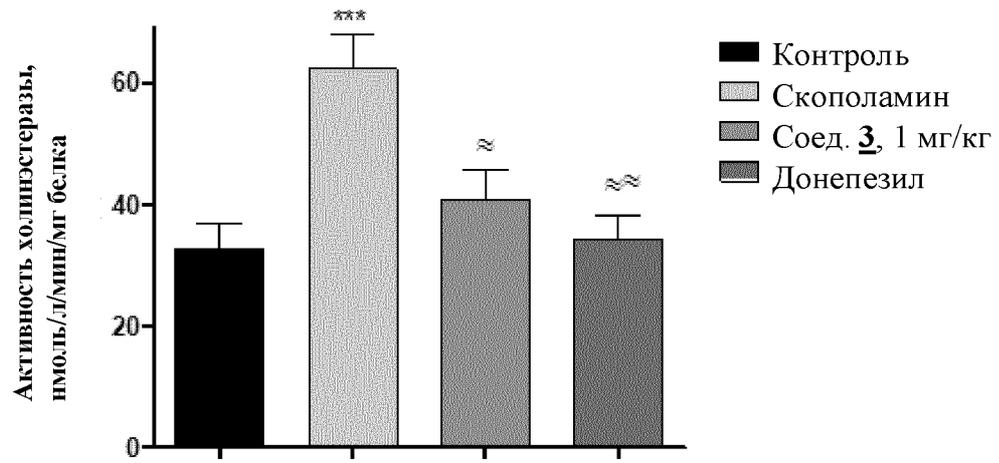
Фиг. 5



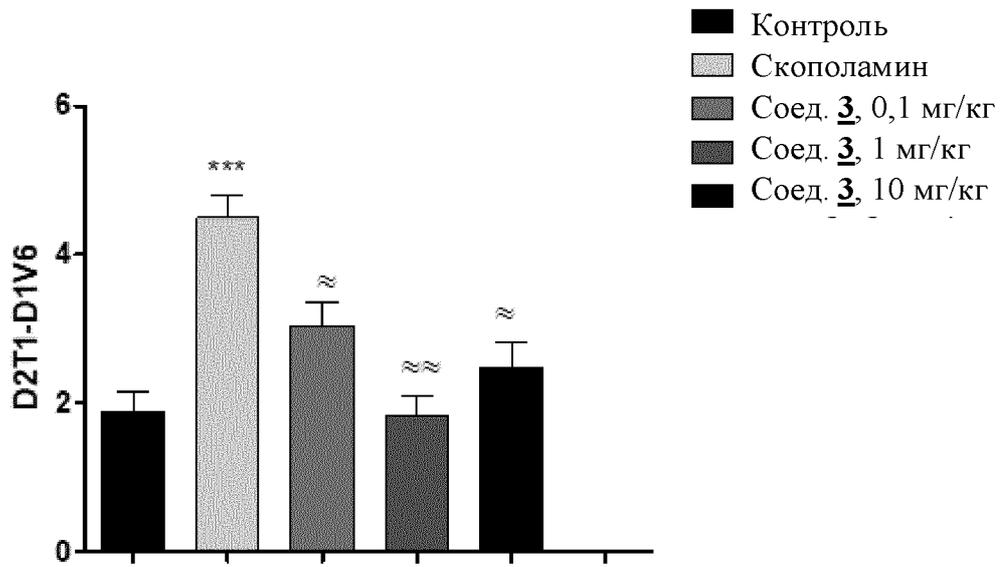
Фиг. 6



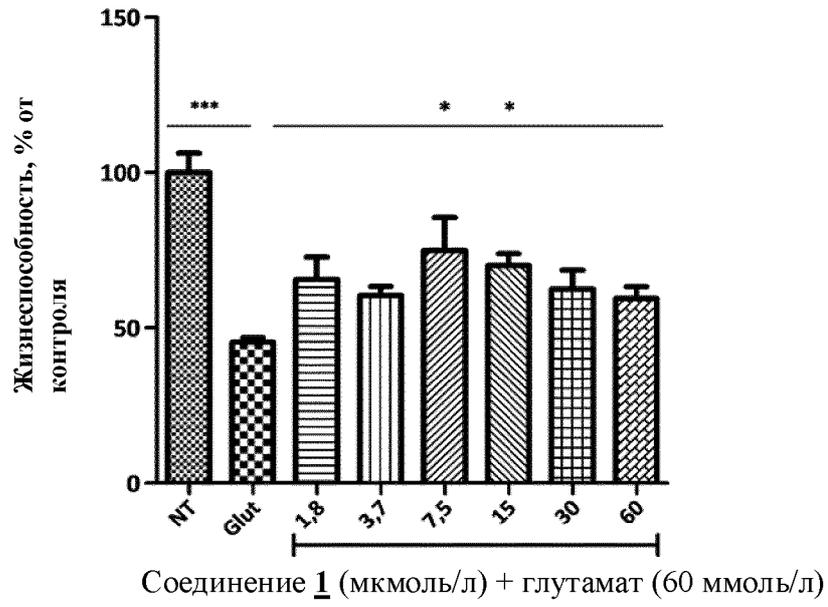
Фиг. 7



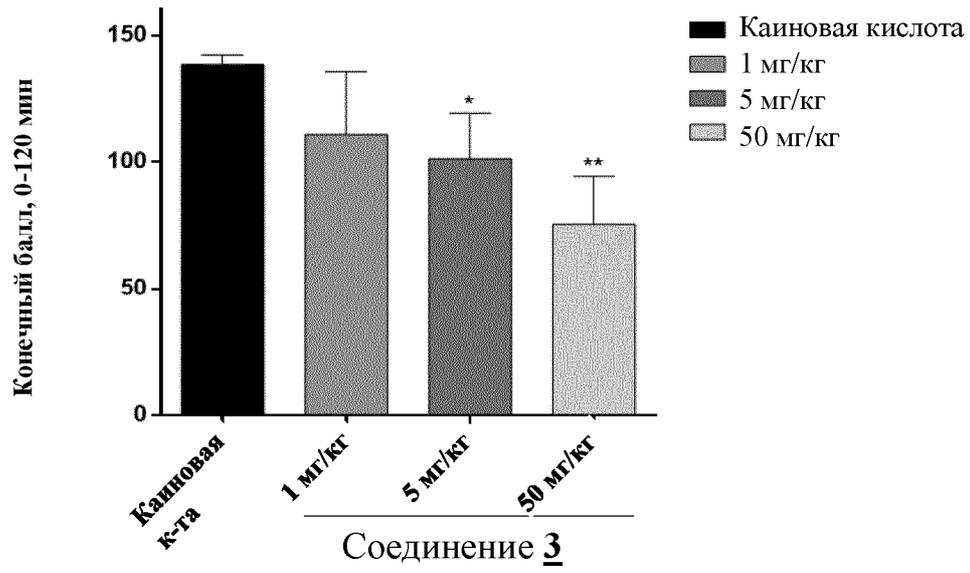
Фиг. 8



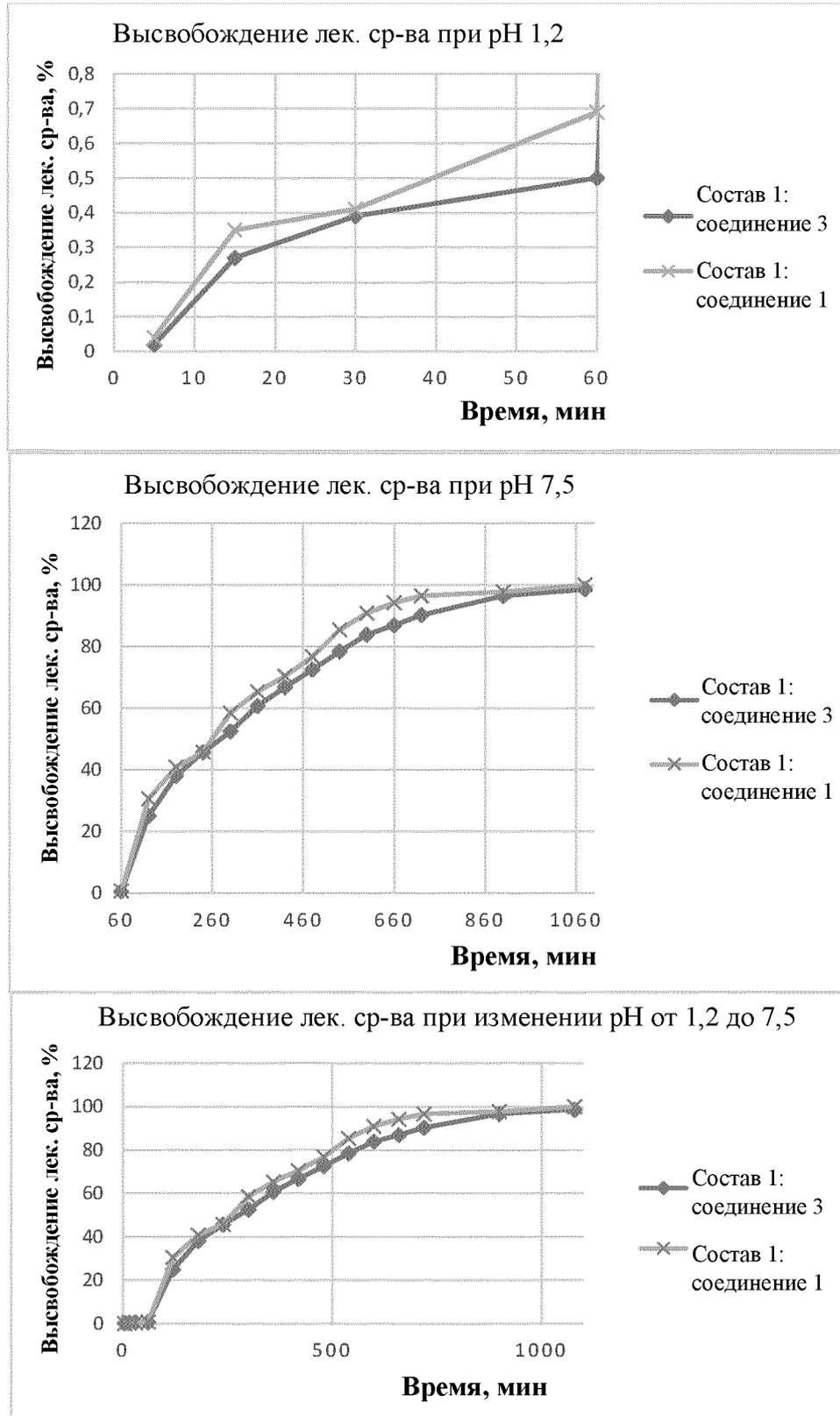
Фиг. 9



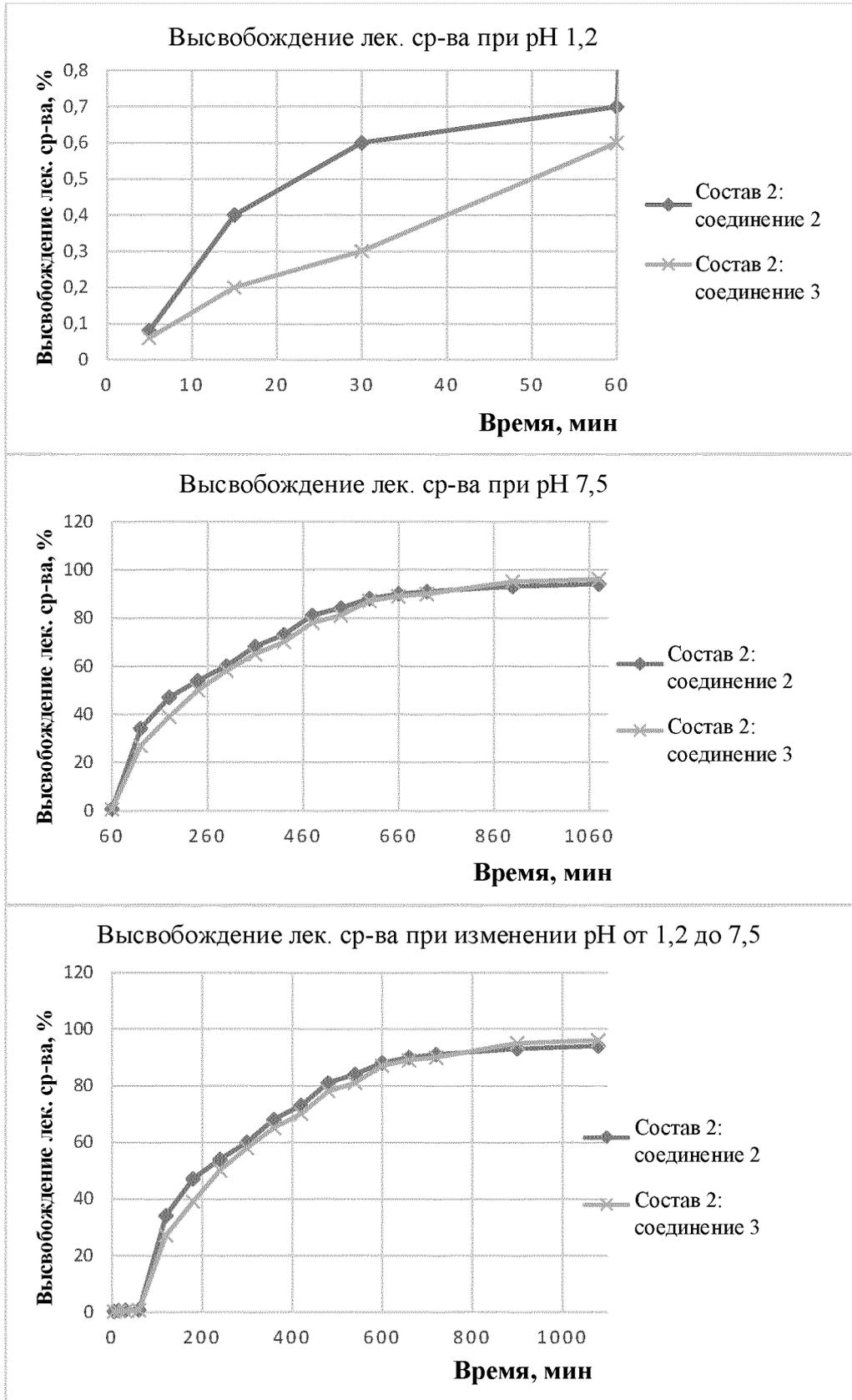
Фиг. 10



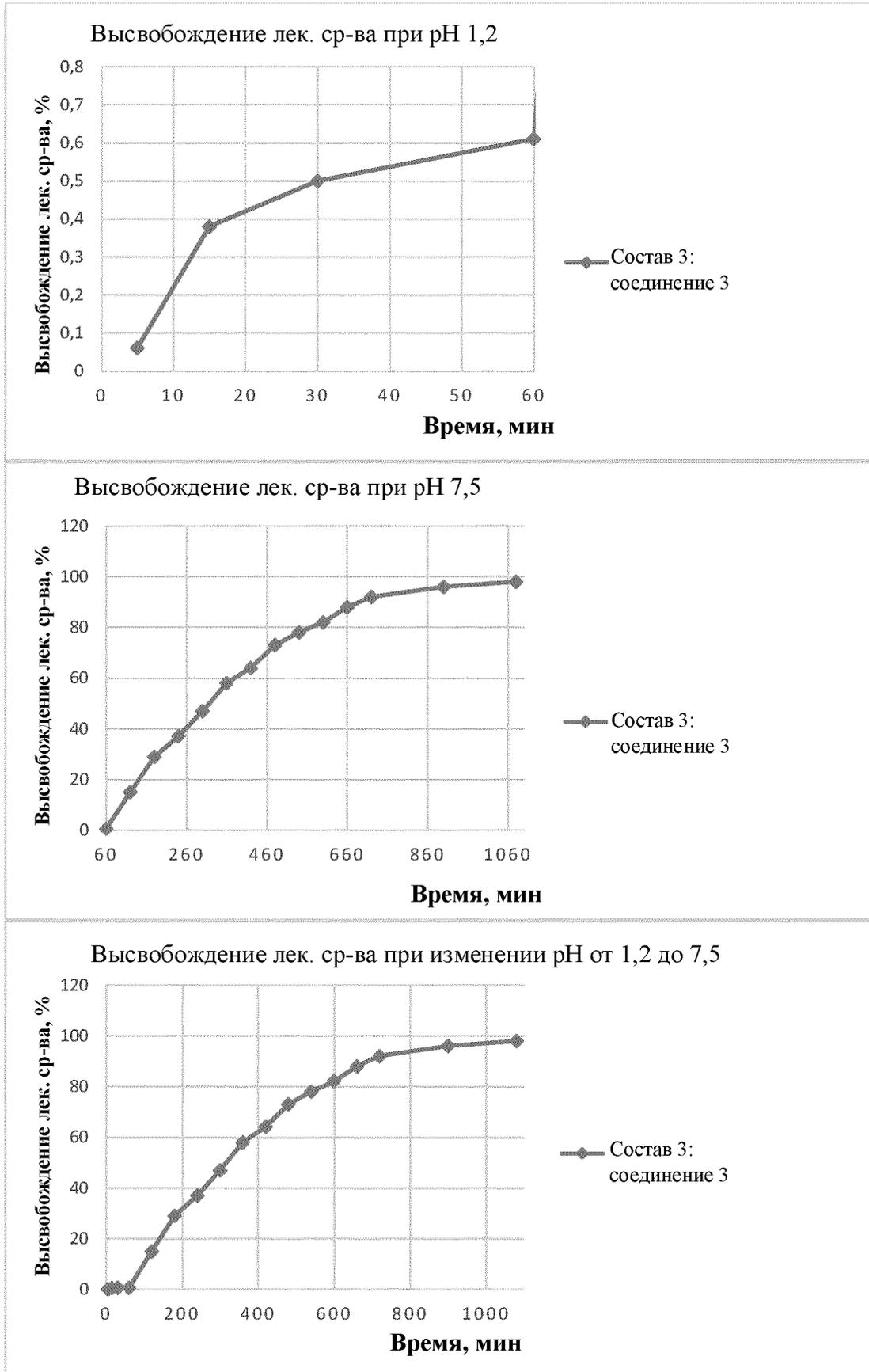
Фиг. 11



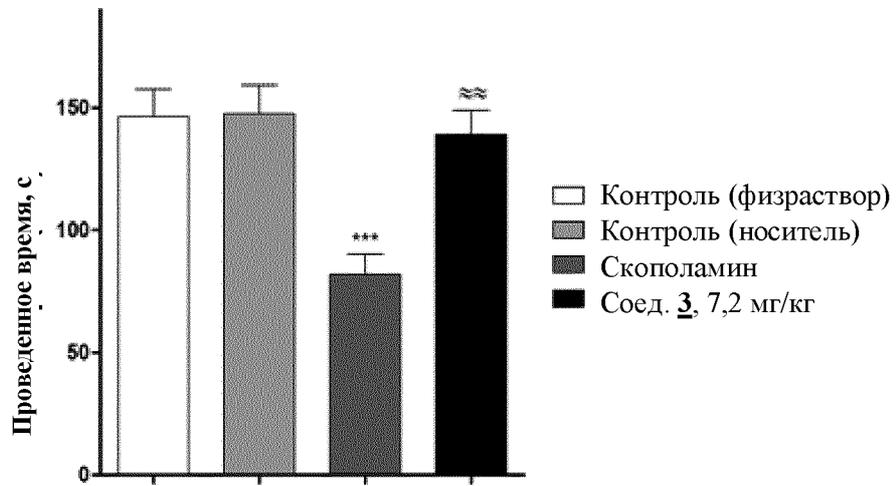
Фиг. 12



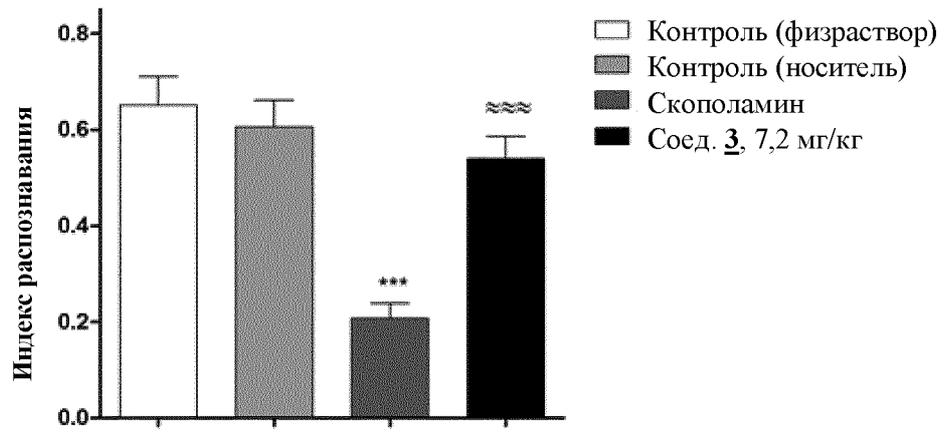
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16