

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392283 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.10.09

(51) Int. Cl. C07D 239/54 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.02.07

(54) ПРОИЗВОДНЫЕ 6-МЕТИЛУРАЦИЛА, ОБЛАДАЮЩИЕ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 21156802.7

(72) Изобретатель:

(32) 2021.02.12

Петров Константин Александрович,
Семенов Вячеслав Энгельсович, Зуева
Ирина Владимировна, Мухамедьяров
Марат Александрович, Синяшин
Олег Герольдович (RU)

(33) EP

(86) PCT/EP2022/052853

(87) WO 2022/171560 2022.08.18

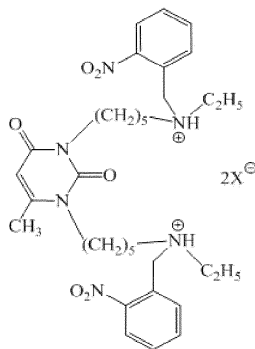
(71) Заявитель:

АВВА ФАРМАСЬЮТИКАЛС ЛТД
(CY)

(74) Представитель:

Квашнин В.П. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к новым производным 6-метилурацила формулы (I)



в которой X представляет собой Cl или Br. Соединения согласно настоящему изобретению обладают антихолинэстеразной активностью. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим соединения согласно настоящему изобретению, и применению соединений согласно настоящему изобретению для лечения болезни Альцгеймера.

A1

202392283

202392283

A1

ПРОИЗВОДНЫЕ 6-МЕТИЛУРАЦИЛА, ОБЛАДАЮЩИЕ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Описание

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к новым производным 6-метилурацила, обладающим антихолинэстеразной активностью, содержащим их фармацевтическим композициям, и их применению для лечения болезни Альцгеймера.

Болезнь Альцгеймера - самое распространенное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся увеличением продукции патологического бета-амилоида. Основным фактором риска болезни - возраст: частота возникновения болезни после 60 лет удваивается каждые пять лет и к 85 годам достигает 30%. Заболевание сопровождается деменцией, множественным когнитивным дефицитом, прогрессирующими нарушениями памяти: у больных проявляется множественный недостаток познавательной функции, в том числе расстройство памяти, связанное с ухудшением запоминания новой и воспроизведением ранее усвоенной информации.

Ведущая роль в патогенезе болезни Альцгеймера придается центральному холинэргическому дефициту, который лежит в основе когнитивных расстройств и определяет выраженность клинических проявлений болезни.

Ингибиторы холинэстераз используются в медицинской практике для фармакологической коррекции последствий дефектов, лежащих в основе болезни Альцгеймера, миастении Гравис. Показана их эффективность и при лечении глаукомы, атонии кишечника, травматических повреждений мозга, алкоголизма, маниакально-депрессивных психозов, шизофрении, старческого слабоумия, аутизма, расстройств сна и др. Фармацевтическая промышленность выпускает множество антихолинэстеразных препаратов: Аминостигмин, Дезоксипеганин, Стефаглабрин, Дистигмин, Хинолитин,

Оксазил, Пиридостигмин, Прозерин, Галантамин, Физостигмин, Донепезил. В зависимости от химической структуры и физико-химических свойств антихолинэстеразные препараты различаются между собой, например, третичные амины (физостигмин, галантомин, донепезил и др.) проникают через биологические мембраны, в том числе через гематоэнцефалический барьер, и оказывают выраженное влияние на ЦНС. Начиная с середины 90-х годов прошлого века ингибиторы ацетилхолинэстеразы (АХЭ) как вещества, улучшающие когнитивные функции, начали применяться при лечении больных с легкой или умеренной степенью выраженности болезни Альцгеймера. Однако, применение традиционных ингибиторов АХЭ эффективно лишь в отношении основных симптомов данного заболевания (нарушений памяти), но, к сожалению, никак не влияет на патогенез заболевания. Данный недостаток существенно ограничивает применение антиАХЭ препаратов. Существуют предпосылки считать, что в случае болезни Альцгеймера ингибиторы АХЭ способны оказывать влияние и на патогенез заболевания, уменьшая агрегацию бета-амилоида. Однако, данное утверждение справедливо не для всех ингибиторов АХЭ, а только для соединений, места связывания которых, включают, так называемый, «периферический анионный сайт» данного фермента. К сожалению, ассортимент ингибиторов АХЭ, связывающихся с «периферическим анионным сайтом» АХЭ, в настоящее время, крайне ограничен.

В ходе поиска эффективных ингибиторов АХЭ был предложен новый класс ингибиторов холинэстераз - алкиламмониевые производные 6-метилурацила, обладающие способностью высокоизбирательно блокировать ацетилхолинэстеразу млекопитающих [Доклады РАН.-1998. -Т. 362, №1. С. 68-70; Доклады РАН. -2001. -Т. 376, №6. -С. 818-822; Совр. проблемы токсикол. - 2004. - № 3. – С. 25-33; Доклады РАН. - 2005. - Т. 401, № 1. - С. 120-123; Хим._фарм. ж. - 2005. - Т.39, № 5. - С. 15-19; Совр. вопросы токсикол. – 2006. - №2.- С.13-22; Chem.-biol. Interactions. – 2008. – Vol.175. - P. 286-292]. Некоторые из найденных алкиламмониевых производных 6-метилурацила было предложено использовать для лечения синдромов патологической мышечной слабости. Кроме того, расчетными методами были определены места их связывания с ферментом - в районе «периферического анионного сайта» АХЭ [MedChemComm. - 2014. - Vol. 5. – N 11. – P. 1729-1735]. Была создана библиотека

соединений, для которых молекулярный докинг указывал в качестве одного из мест связывания с АХЭ её периферический анионный сайт. Эти соединения были синтезированы, исследованы на способность ингибировать *in vitro* АХЭ человека, была оценена их острая токсичность на мышах [ChemMedChem. - 2015 –Vol. 10. N11. – P.1863-1874.].

В патенте РФ № 2565756 заявлен 1,3-бис[5-(*орто*-нитробензил-этиламино)пентил-1]-6-метилурацил для применения для лечения болезни Альцгеймера, для которого установлена доза, восстанавливающая параметры памяти у трансгенных мышей линии B6C3- Tg(APP695)85Db0 Tg(PSENI)85Db0. Согласно описанным экспериментам в головном мозге подопытных мышей анализировались количество амилоидных депозитов. Показано, что для ежедневного внутривнутрибрюшинного применения дозы 5 мг/кг данного соединения достаточно для снижения количества амилоидных депозитов в коре головного мозга трансгенных мышей в среднем на 50%.

Однако 1,3-бис[5-(*орто*-нитробензил-этиламино)пентил-1]-6-метилурацил обладает рядом недостатков, которые ограничивают его применение, так он представляет собой маслянистое вещество, нерастворимое в воде, что не привлекательно для фармацевтической промышленности. Кроме того, он достаточно токсичен (LD₅₀ 51,48 мг/кг, мыши, в/б).

Таким образом, сохраняется острая потребность в малотоксичных и высокоэффективных ингибиторах ацетилхолинэстеразы. Кроме того, фармацевтическая промышленность нуждается в растворимых в воде ингибиторах ацетилхолинэстеразы с целью облегчения процесса получения лекарственных средств.

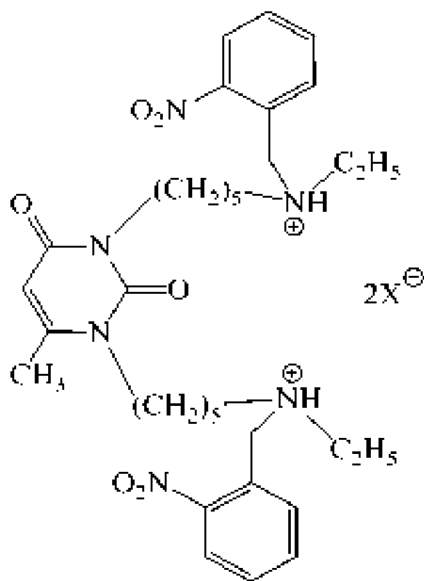
Подробное раскрытие настоящего изобретения

Задача настоящего изобретения состоит в удовлетворении вышеуказанных потребностей, в частности в обеспечении новых водорастворимых ингибиторов ацетилхолинэстеразы для лечения болезни Альцгеймера, обладающих по сравнению с

известными ингибиторами ацетилхолинэстеразы более низкой токсичностью и более высокой активностью. Кроме того, задача настоящего изобретения состоит в расширении арсенала известных средств указанного назначения.

Авторами настоящего изобретения были разработаны новые производные 6-метилурацила, которые, как неожиданно было обнаружено, являются высокоселективными ингибиторами фермента ацетилхолинэстеразы и обладают существенно меньшей токсичностью и значительно более высокой антихолинэстеразной активностью по сравнению с известными антихолинэстеразными средствами, а также являются растворимыми в воде.

Таким образом, настоящее изобретение относится к соединениям Формулы (I)



в которой

X представляет собой Cl или Br.

Соединение формулы (I) представляют собой дигидрогалогениды 1,3-бис[5-(орто-нитробензил-этиламино)пентил-1]-6-метилурацила и обладают антихолинэстеразной

активностью.

Настоящее изобретение также относится к применению соединения Формулы (I) для лечения болезни Альцгеймера.

Настоящее изобретение также относится к соединению Формулы (I) для применения для получения лекарственного средства для лечения болезни Альцгеймера.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения болезни Альцгеймера у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение пациенту эффективного количества соединения Формулы (I).

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим терапевтически эффективное количество соединения Формулы (I) и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

Понятие «терапевтически эффективное количество», используемое в данной заявке, подразумевает количество соединений формулы (I), которое в соединении с его показателями активности и токсичности, а также на основании знаний специалиста является эффективным в данной фармацевтической композиции и обеспечивать достижение указанного терапевтического эффекта. Кроме того, терапевтически эффективное количество зависит от массы тела, пути введения, индивидуальной реакции на активное вещество, типа препарата и времени или интервала, в течение которого выполняется применение.

Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может быть любым известным в данной области техники фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, в частности оно может быть носителем или разбавителем; оно обычно смешано с активным соединением или может быть разбавлено или включено в активное соединение. В случае разбавителя, носитель может быть представлен твердым, полутвердым или жидким материалом, действующим в качестве

вспомогательного вещества или носителя для активного соединения. Композиции также могут включать смачивающие агенты, эмульгаторы, консерванты, увлажняющие агенты и/или ароматизаторы.

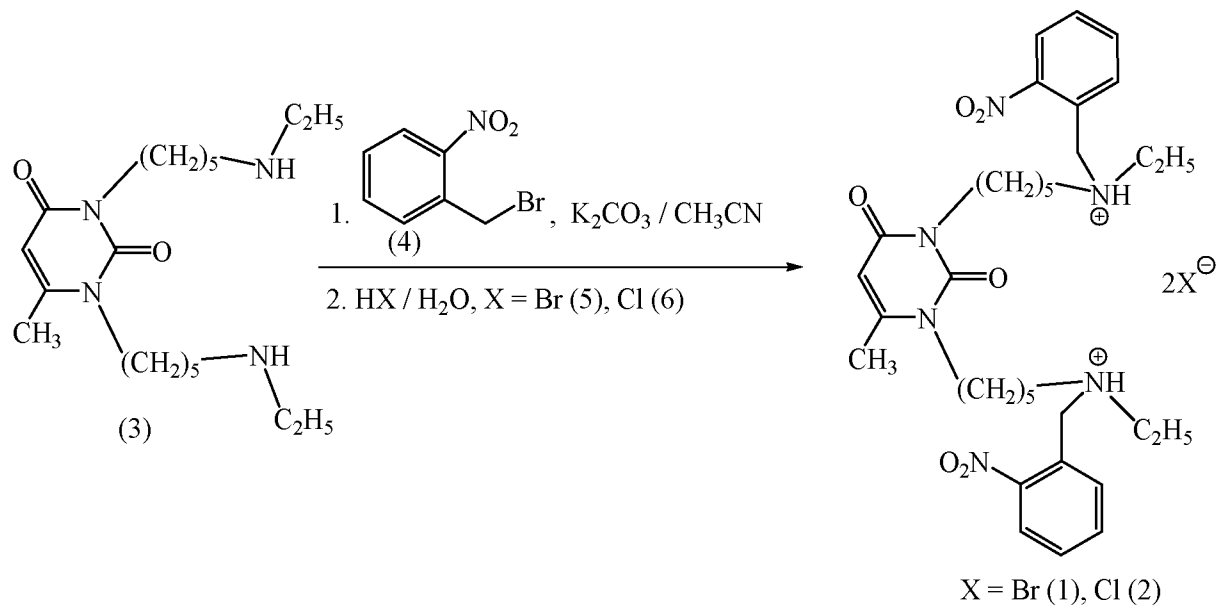
Примеры

Примеры получения

Общая схема получения соединений формулы (I)

Соединения формулы (I) согласно настоящему изобретению получали алкилированием 1,3-бис(5-этиламинопентил-1)-6-метилурацила (3) *орто*-нитробензилбромидом (4) с последующим гидрогалогенированием *in situ* концентрированной бромистоводородной кислотой (5) или концентрированной хлористоводородной кислотой (6) согласно приведенной ниже схеме синтеза. Соединение (3) и способ его получения описаны [Изв.АН. Сер. хим. - 2003. - Т.52. - №7. - С.1511-1515].

Схема синтеза соединений формулы (I)



Пример 1. Получение 1,3-бис[5-(*орто*-нитробензилэтиламино)пентил]-6-метилурацила дигидробромида (1)

К раствору 4.4 г (12.5 ммоль) соединения (3) в 100 мл ацетонитрила добавляют 5.18 г (37.5 ммоль) поташа, 5.4 г (25.0 ммоль) *орто*-нитробензилбромида (4), и реакционную массу перемешивают при температуре 65-70°C в течение 10 ч, после чего отфильтровывают, фильтрат упаривают в вакууме и к остатку добавляют 100 мл дистиллированной воды и 5 мл (62.0 ммоль) 48%-го водного раствора HBr (5). Реакционную массу перемешивают при комнатной температуре 24 ч и отфильтровывают. Фильтрат нагревают до 50°C, добавляют 2 г активированного угля и по охлаждению отфильтровывают. Фильтрат упаривают в вакууме досуха, добавляют 150 мл метилового спирта и 5 г прокаленного сульфата магния. Через 10 ч осушитель отфильтровывают, фильтрат упаривают в вакууме и к остатку добавляют 50 мл диэтилового эфира. Остаток растирают в эфире, декантируют. Процедуру повторяют

еще два раза. Остаток высушивают и получают 8.30 г (85%) соединения (1) в виде порошка светло-оранжевого цвета.

1,3-Бис[5-(орто-нитробензилэтиламино)пентил]-6-метилурацила дигидробромид (1) имеет следующие физико-химические характеристики: т. пл. 95-101 °С; спектр ЯМР ^1H (500 МГц) в CDCl_3 , δ , м.д.: 1.24-1.27 (м, 6H, $2\text{NCH}_2\text{CH}_3$), 1.47-1.50 (м, 4H, 2CH_2), 1.61-1.68 (м, 4H, 2CH_2), 1.92-1.96 (м, 4H, 2CH_2), 2.26 (с, 3H, $\text{C}_{\text{yp}}\text{CH}_3$), 3.12-3.32 (м, 8H, 4NCH_2), 3.83-3.87 (т, 2H, $\text{N}_{\text{yp}}\text{CH}_2$, $J=7.6$ Гц), 3.89-3.92 (т, 2H, $\text{N}_{\text{yp}}\text{CH}_2$, $J=6.5$ Гц), 4.64-4.70 (м, 4H, $2\text{NCH}_2\text{Ph}$), 5.60 (с, 1H, $\text{C}_{\text{yp}}\text{H}$), 7.65 (м, 2H, 2ArH), 7.81 (м, 2H, 2ArH), 8.06 (м, 2H, 2ArH), 8.66 (м, 2H, 2ArH), 11.35 (уш.с, 2H, $2\text{N}^+\text{H}$); спектр ЯМР ^1H (600 МГц) в D_2O , δ , м.д.: 1.37-1.45 (м, 10H, $2\text{NCH}_2\text{CH}_3$, 2CH_2), 1.61-1.70 (м., 4H, 2CH_2), 1.81-1.90 (м., 4H, 2CH_2), 2.31 (с, 3H, $\text{C}_{\text{yp}}\text{CH}_3$), 3.27-3.38 (м, 8H, 4NCH_2), 3.83-3.87 (м, 4H, $2\text{N}_{\text{yp}}\text{CH}_2$), 4.65-4.70 (м, 4H, $2\text{NCH}_2\text{Ph}$), 5.73 (с, 1H, $\text{C}_{\text{yp}}\text{H}$), 7.75 (м, 4H, 4ArH), 7.87 (м, 2H, 2ArH), 8.31 (м., 2H, 2ArH); спектр ЯМР ^{13}C (400 МГц) в CDCl_3 , δ , м.д.: 8.9, 15.1, 20.0, 22.5, 22.8, 23.7, 26.7, 28.1, 39.7, 39.9, 40.2, 44.6, 48.2, 48.4, 52.3, 53.3, 65.5, 101.3, 124.5, 124.6, 125.8, 131.5, 134.6, 135.1, 135.2, 148.8, 148.9, 151.8, 162.0. ИК-спектр в тонком слое, ν , cm^{-1} : 2944 с., 2865 сл., 2631 с., 1694 с., 1653 о.с., 1532 о.с., 1470 с., 1432 с., 1344 с., 1205 сл., 1108 сл., 866 сл., 795 сл.; MALDI-MS (матрица - *пара*-нитроанилин): 621.4 $[\text{M-H-2HBr}]^+$, 622.4 $[\text{M-2HBr}]^+$, рассчитано для $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{Br}_2\text{N}_6\text{O}_6$ 621.3, 622.4, соответственно. Найдено, %: С 50.57, Н 6.13, Br 20.43, N 10.68. Брутто-формула $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{Br}_2\text{N}_6\text{O}_6$. Вычислено, %: С 50.52, Н 6.17, Br 20.37, N 10.71.

Полученное соединение представляет собой гигроскопичный порошок с цветом от светло-оранжевого до оранжевого, растворимый в хлороформе, диметилформамиде, диметилсульфоксиде, этиловом спирте, воде.

Пример 2. Получение 1,3-бис[5-(орто-нитробензилэтиламино)пентил]-6-метилурацила дигидрохлорида (2)

К раствору 4.4 г (12.5 ммоль) соединения (3) в 100 мл ацетонитрила добавляют 5.18 г (37.5 ммоль) поташа, 5.4 г (25.0 ммоль) орто-нитробензилбромида (4), и реакционную

массу перемешивают при температуре 65-70°C в течение 10 ч, после чего отфильтровывают, фильтрат упаривают в вакууме и к остатку добавляют 100 мл дистиллированной воды и 6 мл (60.0 ммоль) 36%-го водного раствора HCl (6). Реакционную массу перемешивают при комнатной температуре 24 ч и отфильтровывают. Фильтрат нагревают до 50°C, добавляют 2 г активированного угля и по охлаждению отфильтровывают. Фильтрат упаривают в вакууме досуха, добавляют 150 мл метилового спирта и 5 г прокаленного сульфата магния. Через 10 ч осушитель отфильтровывают, фильтрат упаривают в вакууме и к остатку добавляют 50 мл диэтилового эфира. Остаток растирают в эфире, декантируют. Процедуру повторяют еще два раза. Остаток высушивают и получают 71.30 г (82%) соединения (2) в виде порошка с желтоватым оттенком.

1,3-Бис[5-(орто-нитробензилэтиламино)пентил]-6-метилурацила дигидрохлорид

(2) имеет следующие физико-химические характеристики: т. пл. 64-67 °С; спектр ЯМР ^1H (600 МГц) в D_2O , δ , м.д.: 1.36-1.50 (м, 10H, $2\text{NCH}_2\text{CH}_3$, 2CH_2), 1.63 (м, 2H, CH_2), 1.69 (м, 2H, CH_2), 1.80 (м, 2H, CH_2), 1.88 (м, 2H, CH_2), 2.31 (с, 3H, $\text{C}_{\text{yp}}\text{CH}_3$), 3.24-3.27 (м, 4H, 2NCH_2), 3.29-3.33 (м, 4H, 2NCH_2), 3.83-3.87 (м, 4H, $2\text{N}_{\text{yp}}\text{CH}_2$), 4.57-4.65 (м, 4H, $2\text{NCH}_2\text{Ph}$), 5.76 (с, 1H, $\text{C}_{\text{yp}}\text{H}$), 7.70 (м, 2H, 2ArH), 7.75 (м, 2H, 2ArH), 7.86 (м, 2H, 2ArH), 8.31 (м, 2H, 2ArH); спектр ЯМР ^1H (500 МГц) в DMSO-d_6 , δ , м.д.: 1.30-1.33 (м, 10H, $2\text{NCH}_2\text{CH}_3$, 2CH_2), 1.55 (м, 4H, 2CH_2), 1.81 (м, 4H, 2CH_2), 2.30 (с, 3H, $\text{C}_{\text{yp}}\text{CH}_3$), 3.07 (м, 4H, 2NCH_2), 3.16 (м, 4H, 2NCH_2), 3.73-3.77 (м, 4H, $2\text{N}_{\text{yp}}\text{CH}_2$), 4.59-4.64 (м, 4H, $2\text{NCH}_2\text{Ph}$), 5.65 (с, 1H, $\text{C}_{\text{yp}}\text{H}$), 7.76 (м, 2H, 2ArH), 7.84 (м, 2H, 2ArH), 8.12 (м, 2H, 2ArH), 8.20 (м, 2H, 2ArH), 10.61 (1H, NH), 10.75 (1H, NH); спектр ЯМР ^{13}C (400 МГц) в D_2O , δ , м.д.: 7.9, 14.2, 19.2, 22.5, 22.6, 23.1, 23.2, 26.3, 27.3, 41.1, 45.2, 48.5, 52.5, 54.5, 66.0, 100.9, 124.7, 126.5, 132.2, 135.3, 135.5, 148.4, 152.8, 155.5, 164.6. ИК-спектр в тонком слое, ν , cm^{-1} : 2430 о.с., 2948 с., 2865 сл., 2634 сл., 1695 с., 1652 о.с., 1532 о.с., 1471 с., 1432 сл., 1344 с., 1204 сл., 1108 сл., 866 сл., 795 сл.; MALDI-MS (матрица - *пара*-нитроанилин): 621.4 $[\text{M-H-2HCl}]^+$, 622.4 $[\text{M-2HCl}]^+$, рассчитано для $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_6$ 621.3, 622.4, соответственно. Найдено, %: C 56.97, H 6.95, Cl 10.19, N 12.08. Брутто-формула $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{Br}_2\text{N}_6\text{O}_6$. Вычислено, %: C 57.04, H 7.00, Cl 10.17, N 12.02.

Полученное соединение представляет собой гигроскопичный порошок с светло-желтым цветом, растворимый в диметилформамиде, диметилсульфоксиде, этиловом спирте, воде.

Биологическая активность

Пример 3. Определение антихолинэстеразной активности соединений формулы (I) согласно настоящему изобретению

Регистрацию ферментативной реакции осуществляли согласно методу Элмана [Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr., Feather-Stone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961, №7, С.88-95]. Анализ зависимости активности холинэстеразы от концентрации ингибитора проводили уравнением Хилла (Hill) с вычислением среднеэффективной концентрации – IC₅₀. Ацетилхолинэстераза и бутирилхолинэстераза человека были куплены в Sigma-Aldrich.

Таблица 1. Антихолинэстеразная активность и токсичность соединений (1) и (2)

Вещество	АХЭ эритроцитов человека, IC ₅₀ моль/л	БуХЭ сыворотки крови человека, IC ₅₀ , моль/л	ЛД ₅₀ , мг/кг (мышь, в/б)	ЛД ₅₀ , мг/кг (мышь, п/о)
Соединение (1)	3.2×10^{-10}	3.0×10^{-5}	199	520
Соединение (2)	1.2×10^{-10}	2.3×10^{-5}	150	290
1,3-бис[5-(орто- нитробензил- этиламино)пентил-	7.1×10^{-9}	3.0×10^{-7}	51	-

1]-6-метилурацил				
Донепезил гидрохлорид	6.7×10^{-9}	7.9×10^{-6}	5	45

Соединение (1) - 1,3-бис[5-(*орто*-нитробензилэтиламино)пентил]-6-метилурацила дигидробромид

Соединение (2) - 1,3-бис[5-(*орто*-нитробензилэтиламино)пентил]-6-метилурацила дигидрохлорид

Результаты ингибиторной активности соединений формулы (I) согласно настоящему изобретению, приведенные в таблице 1, свидетельствуют о том, что они являются:

- высокоизбирательным ингибитором АХЭ (эффективность в отношении ацетилхолинэстеразы на 5 порядков выше по сравнению с бутирилхолинэстеразой);

- антихолинэстеразная активность на порядок выше чем у 1,3-бис[5-(*орто*-нитробензил-этиламино)пентил-1]-6-метилурацила и донепезил гидрохлорида.

Пример 4. Определение общетоксического действия соединений формулы (I) согласно настоящему изобретению

Изучение общетоксического действия заявляемых соединений проводили согласно «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств». [М.: Гриф и К, 2012. Под ред. А.Н. Миронова] на мышах линии CD-1 (Питомник «Пушино», Московская область) обоего пола массой $19,0 \pm 2,0$ г., содержащихся на стандартном рационе питания в условиях режима освещения помещения день/ночь 12 часов при температуре 22 °С. Данные токсикологической оценки соединений приведены в таблице 1. Для сравнения, ЛД₅₀ 1,3-бис[5-(*орто*-нитробензил-этиламино)пентил-1]-6-метилурацила (соединения-прототипа) составляет 51 мг/кг при внутривнутрибрюшинном введении, т.е. соединение (1) формулы (I) согласно настоящему изобретению практически в 4 раза менее токсично, и соединение (2) формулы (I) согласно настоящему изобретению практически в 3 раза менее токсично. В сравнении с донепезил гидрохлоридом (традиционно применяемым препаратом в терапии болезни

Альцгеймера) при внутривенном введении соединения (1) формулы (I) согласно настоящему изобретению менее токсично в 40 раз, и введении соединения (2) формулы (I) согласно настоящему изобретению менее токсично в 30 раз, а при пероральном введении соединения (1) и (2) формулы (I) согласно настоящему изобретению менее токсичны в 12 и 6 раз соответственно.

Пример 5. Терапия симптомов болезни Альцгеймера с применением соединения (1) в условиях генетической модели на мышах

Соединение (1) формулы (I) согласно настоящему изобретению было протестировано *in vivo* на способность улучшать рабочую память мышей в условиях генетической модели болезни Альцгеймера. Эксперименты проводили на трансгенных мышах генотипа B6C3-Tg(APP695)85Dbo Tg(PSEN1)85Dbo, экспрессирующих химерный мышинный/человеческий белок-предшественник амилоида и мутантный человеческий пресенилин-1. Линия была закуплена в The Jackson Laboratory (США) и содержалась в питомнике лабораторных животных «Пушино» (г. Пушино, Московская область). Для данной линии трансгенных мышей характерно увеличение с возрастом количества бета-амилоидных отложений (бляшек) в головном мозге. Возраст трансгенных мышей составлял 9 месяцев на начало эксперимента.

Выводы о состоянии пространственной памяти были сделаны на основании тестирования мышей с предварительной пищевой депривацией (уменьшение корма до 2.5 грамм в день) в Т-образном лабиринте в модели «вознаграждаемое чередование» в течение 14 дней [Robert M J Deacon, J Nicholas P Rawlins T-maze alternation in the rodent. Nature protocols. 2006. – Vol. 1. – N 1. P. 7-12]. Критерием обученности служило выполнение животным более 80% правильных заходов в рукав с едой в течение 3-х дней подряд.

За 20 минут до начала эксперимента опытным группам трансгенных животных (n=9-10) вводили перорально соединение (1) формулы (I) из 0,01%-го и 0,1%-го водного раствора в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг соответственно. Группе, получавшей препарат сравнения, перорально вводили донепезила гидрохлорид из 0,01% водного раствора

(Sigma-Aldrich) в дозе 1 мг/кг. Контрольным группам трансгенных и нетрансгенных мышей перорально вводили эквивалентное количество воды.

Таблица 2. Средний процент выбора правильного направления мышами в тесте «вознаграждаемое чередование» в Т-образном лабиринте при применении соединения (1) формулы (I)

Группа животных	Средний процент выбора правильного направления	р-значение*
Вода (Tg-)	68 ±3	
Вода (Tg+)	59 ±2*	0,017
Соединение (1), 1 мг/кг	62 ±3	0,145
Соединение (1), 10 мг/кг	65±2	0,597
Донепезила гидрохлорид, 1 мг/кг	66±2	0,583

*Примечание: *-различие с контролем (Tg-) статистически достоверно при $p \leq 0.05$. (Сравнение выполнено по Манн-Уитни)

Таблица 3. Процент обучившихся мышей в тесте «вознаграждаемое чередование» в Т-образном лабиринте при применении соединения (1) формулы (I)

Группа животных (количество животных в группе)	Процент обучившихся мышей (%)	р-значение*
Вода (Tg-), (n=7)	71	
Вода (Tg+), (n=9)	11*	0,035
Соединение (1), 1 мг/кг, (n=10)	40	0,03348
Соединение (1), 10 мг/кг, (n=9)	56	0,6329
Донепезила гидрохлорид, 1 мг/кг, (n=10)	50	0,6221

*Примечание: * - различие с контролем (Tg-) статистически достоверно при $p \leq 0.05$. (сравнение выполнено с помощью точного теста Фишера)

Поскольку после применения соединения (1) формулы (I) согласно настоящему изобретению в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг отсутствовали статистически значимые

различия в процентах выбора правильного направления в Т-образном лабиринте по сравнению с показателями здоровых животных (таблицы 2 и 3), соединение (1) формулы (I) согласно настоящему изобретению при пероральном введении эффективно для коррекции нарушений памяти.

Пример 6. Терапия симптомов болезни Альцгеймера с применением соединения (2) в условиях генетической модели на мышах

Соединение (2) формулы (I) согласно настоящему изобретению было протестировано *in vivo* на способность улучшать рабочую память мышей в условиях генетической модели болезни Альцгеймера. Эксперименты проводили на трансгенных мышах генотипа B6C3-Tg(APP695)85Dbo Tg(PSENI)85Dbo, экспрессирующих химерный мышиний/человеческий белок-предшественник амилоида и мутантный человеческий пресенилин-1. Линия была закуплена в The Jackson Laboratory (США) и содержалась в питомнике лабораторных животных «Пушино» (г. Пушино, Московская область). Для данной линии трансгенных мышей характерно увеличение с возрастом количества бета-амилоидных отложений (бляшек) в головном мозге. Возраст трансгенных мышей составлял 8 месяцев на начало эксперимента.

Выводы о состоянии пространственной памяти были сделаны на основании тестирования мышей с предварительной пищевой депривацией (уменьшение корма до 2.5 грамм в день) в Т-образном лабиринте в модели «вознаграждаемое чередование» в течение 14 дней [Robert M J Deacon, J Nicholas P Rawlins T-maze alternation in the rodent. Nature protocols. 2006. – Vol. 1. – N 1. P. 7-12]. Критерием обученности служило выполнение животным более 80% правильных заходов в рукав с едой в течение 3-х дней подряд.

За 20 минут до начала эксперимента опытным группам трансгенных животных (n=9-10) вводили перорально соединение (2) формулы (I) 0,01%-го, 0,05%-го и 0,1%-го водного раствора в дозах 1 мг/кг, 5 мг/кг и 10 мг/кг соответственно. Группе, получавшей препарат сравнения, перорально вводили донепезила гидрохлорид из 0,05% водного

раствора (Sigma-Aldrich) в дозе 5 мг/кг. Контрольным группам трансгенных и нетрансгенных мышей перорально вводили эквивалентное количество воды.

Таблица 4. Средний процент выбора правильного направления мышами в тесте «вознаграждаемое чередование» в Т-образном лабиринте при применении соединения (2) формулы (I)

Группа животных	Средний процент выбора правильного направления	p-значение*
Вода (Tg-)	77 ±3	
Вода (Tg+)	43 ±3***	0,000
Соединение (2), 1 мг/кг	72 ±2	0,185
Соединение (2) 5 мг/кг	75 ±3	0,650
Соединение (2), 10 мг/кг	69±3	0,068
Донепезила гидрохлорид, 5 мг/кг	69±2	0,054

*Примечание: ***-различие с контролем (Tg-) статистически достоверно при $p \leq 0.001$. (Сравнение выполнено по Манн-Уитни)

Таблица 5. Процент обучившихся мышей в тесте «вознаграждаемое чередование» в Т-образном лабиринте при применении соединения (2) формулы (I)

Группа животных (количество животных в группе)	Процент обучившихся мышей	p-значение*
Вода (Tg-), (n=10)	100	0,000
Вода (Tg+), (n=10)	0***	0,0003
Соединение (2) 1 мг/кг, (n=10)	60	0,0867
Соединение (2) 5 мг/кг, (n=10)	100	1,000
Соединение (2) 10 мг/кг, (n=9)	67	0,0867
Донепезила гидрохлорид, 5 мг/кг, (n=10)	70	0,1544

*Примечание: *** - различие с контролем (Tg-) статистически достоверно при $p \leq 0.001$. (сравнение выполнено с помощью точного теста Фишера)

Поскольку после применения соединения (2) формулы (I) согласно настоящему изобретению в дозах 1 мг/кг, 5 мг/кг и 10 мг/кг отсутствовали статистически значимые различия в процентах выбора правильного направления в Т-образном лабиринте по сравнению с показателями здоровых животных (таблицы 4 и 5), соединение (2) формулы (I) согласно настоящему изобретению при пероральном введении эффективно для коррекции нарушений памяти.

Пример 7. Тестирование соединения (1) на способность уменьшать количество амилоидных в коре головного мозга животных с генетической моделью болезни Альцгеймера

Соединение (1) формулы (I) согласно настоящему изобретению было протестировано *in vivo* на способность уменьшать количество амилоидных бляшек в головном мозге трансгенных мышей генотипа B6C3-Tg(APP695)85Dbo Tg(PSENI)85Dbo, экспрессирующих химерный мышинный/человеческий белок-предшественник амилоида и мутантный человеческий пресенилин-1. Линия была закуплена в The Jackson Laboratory (США) и содержалась в питомнике лабораторных животных «Пушино» (г. Пушино, Московская область). Возраст трансгенных мышей составлял 9 месяцев на начало эксперимента.

Опытным группам трансгенных животных (n=9-10) вводили перорально соединение (1) формулы (I) в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг соответственно. Группе, получавшей препарат сравнения, перорально вводили донепезила гидрохлорид в дозе 1 мг/кг. Контрольным группам трансгенных мышей перорально вводили эквивалентное количество воды (Вода (Tg+)).

Оценка бета-амилоидных отложений осуществлялась после умерщвления на срезах головного мозга мышей (20 мкм) с применением флуоресцентного красителя Thioflavin S и флуоресцентного микроскопа Olympus BX51W1, по методике, описанной в статье [<http://library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/MANUALS/MANUALS.html>].

Таблица 6. Количество амилоидных бляшек в головном мозге трансгенных мышей (в поле зрения, увеличение x 10) соединения (1) формулы (I)

Группа животных	Количество амилоидных бляшек в коре головного мозга	p-значение*
Вода (Tg+)	40±2	
Соединение (1), 1 мг/кг	28±2***	0,000
Соединение (1), 10 мг/кг	22±1***	0,000
Донепезила гидрохлорид, 1 мг/кг	45±2	0,054

*Примечание: ***-различие с контролем (Tg+) статистически достоверно при $p \leq 0.001$. (Сравнение выполнено по Манн-Уитни)

Результаты окрашивания префронтальных зон коры головного мозга на агрегированный бета-амилоид, приведенные в таблице 6, свидетельствуют о достоверном уменьшении количества бета-амилоидных бляшек. Введение донепезила гидрохлорида не оказало достоверное влияние на количество амилоидных бляшек в коре головного мозга. Этот факт позволяет рассматривать соединение (1) формулы (I) согласно настоящему изобретению в качестве более эффективного чем донепезила гидрохлорид средства для предотвращения образования амилоидных бляшек.

Пример 8. Тестирование соединения (2) на способность уменьшать количество амилоидных в коре головного мозга животных с генетической моделью болезни Альцгеймера

Соединение (2) формулы (I) согласно настоящему изобретению было протестировано *in vivo* на способность уменьшать количество амилоидных бляшек в головном мозге трансгенных мышей генотипа B6C3-Tg(APP695)85Dbo Tg(PSEN1)85Dbo, экспрессирующих химерный мышинный/человеческий белок-предшественник амилоида и мутантный человеческий пресенелин-1. Линия была закуплена в The Jackson Laboratory (США) и содержалась в питомнике лабораторных животных «Пушино» (г. Пушино, Московская область). Возраст трансгенных мышей составлял 8 месяцев на начало эксперимента.

Опытным группам трансгенных животных (n=9-10) вводили перорально соединение (2) формулы (I) в дозах 1 мг/кг, 5 мг/кг и 10 мг/кг соответственно. Группе, получавшей препарат сравнения, перорально вводили донепезила гидрохлорид в дозе 5 мг/кг. Контрольным группам трансгенных мышей перорально вводили эквивалентное количество воды (Вода (Tg+)).

Оценка бета-амилоидных отложений осуществлялась после умерщвления на срезах головного мозга мышей (20 мкм) с применением флуоресцентного красителя Thioflavin S и флуоресцентного микроскопа Olympus BX51W1, по методике, описанной в статье [<http://library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/MANUALS/MANUALS.html>].

Таблица 7. Количество амилоидных бляшек в головном мозге трансгенных мышей (в поле зрения, увеличение x 10) соединения (2) формулы (I)

Группа животных	Количество амилоидных бляшек в коре головного мозга	p-значение*
Вода (Tg+)	12±1	
Соединение (2), 1 мг/кг	11±1	0,143
Соединение (2), 5 мг/кг	7±0,5*	0,023
Соединение (2), 10 мг/кг	7±0,4***	0,000
Донепезила гидрохлорид моногидрат, 5 мг/кг	12±1	0,055

*Примечание: *-различие с контролем (Tg+) статистически достоверно при $p \leq 0.05$, ***-при $p \leq 0.001$ (Сравнение с контролем выполнено по Манн-Уитни)

Результаты окрашивания префронтальных зон коры головного мозга на агрегированный бета-амилоид, приведенные в таблице 7, свидетельствуют о достоверном уменьшении количества бета-амилоидных бляшек. Введение донепезила гидрохлорида не оказало достоверное влияние на количество амилоидных бляшек в коре головного мозга. Этот факт позволяет рассматривать соединение (2) формулы (I) согласно настоящему изобретению в качестве более эффективного чем донепезила гидрохлорид средства для предотвращения образования амилоидных бляшек.

Результаты

Предложены новые соединения - 1,3-бис[5-(*орто*-нитробензил-этиламино)пентил-1]-6-метилурацила дигидрогалогениды, которые:

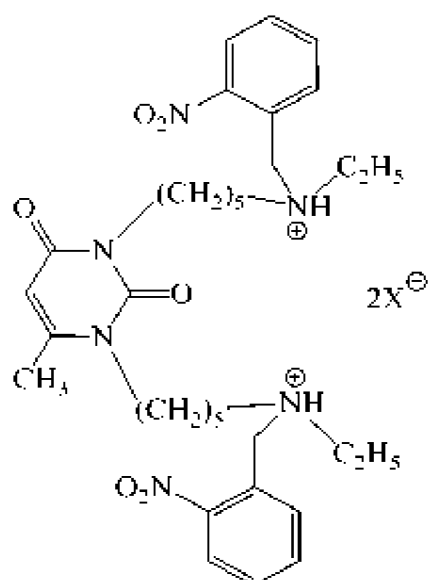
- являются высокоселективными ингибиторами фермента ацетилхолинэстеразы, причем антихолинэстеразная активность на порядок выше чем у 1,3-бис[5-(*орто*-нитробензил-этиламино)пентил-1]-6-метилурацила и донепезил гидрохлорида;
- купируют симптомы болезни Альцгеймера и более эффективно снижают количество амилоидных бляшек в головном мозге трансгенных мышей по сравнению с донепезил гидрохлоридом в сходной дозе;
- обладают хорошей растворимостью в воде;
- обладают низкой для антихолинэстеразных средств токсичностью.

Пример 9. Получение фармацевтической композиции

Для получения фармацевтической композиции соединение согласно настоящему изобретению смешивали в качестве активного ингредиента в фармацевтически эффективном количестве с фармацевтически приемлемым носителем (например, водой) согласно принятым в фармацевтике способам.

Формула изобретения

1. Соединение формулы (I):



в которой

X представляет собой Cl или Br.

2. Соединение формулы (I) по п. 1 для применения для лечения болезни Альцгеймера.
3. Применение соединения формулы (I) по п. 1 для получения лекарственного средства для лечения болезни Альцгеймера.
4. Способ лечения болезни Альцгеймера у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту эффективного количества соединения формулы (I) по п. 1.
5. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество соединения формулы (I) по п. 1 и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.