

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047947**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.09.30**

**(21)** Номер заявки  
**201892008**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.04.21**

**(51)** Int. Cl. **A61K 31/519** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)

---

**(54) СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ И СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ СОСТОЯНИЙ**

---

**(31)** 62/325,860

**(32)** 2016.04.21

**(33)** US

**(43)** 2019.06.28

**(86)** PCT/US2017/028996

**(87)** WO 2017/185061 2017.10.26

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**АСТРОСАЙТ ФАРМАСЬЮТИКАЛС,  
ИНК.; БОРД ОФ РЕДЖЕНТС,  
ЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕХАС  
СИСТЕМ; ЗЕ ЮНАЙТИД  
СТЭЙТС ОФ АМЕРИКА,  
ЭЗ РЕПРЕЗЕНТИД БАЙ ЗЕ  
СЕКРЕТАРИ, ДЕПАРТМЕНТ ОФ  
ХЭЛС ЭНД ХЬЮМАН СЕРВИСЕЗ  
(US)**

**(56)** US-A1-20110046166

WO-A1-2006091905

LEWERENZ et al. 'A3 Receptors  
in Cortical Neurons: Pharmacological Aspects  
and Neuroprotection during Hypoxia', DRUG  
DEVELOPMENT RESEARCH, 2003, Vol.58, pp.  
420-427. pg 421, col 2, para 1; pg 422, Fig 1

US-A-5773423

US-B2-6586413

**(72)** Изобретатель:  
**Коринек Уильям С., Лехлейтер  
Джеймс Д., Листон Теодор И.,  
Джейкобсон Кеннет А. (US)**

**(74)** Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

---

**(57)** Настоящее изобретение относится к соединениям и способам их применения для лечения конкретных расстройств и состояний, например, повреждений головного мозга, таких как инсульт или черепно-мозговые травмы.

---

**B1**

**047947**

**047947**

**B1**

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/325860, поданной 21 апреля 2016, полное содержание которой включено в данное описание посредством ссылки.

#### **Область техники**

Настоящее изобретение относится к соединениям и способам их применения для лечения, облегчения или ускорения восстановления от конкретных состояний головного мозга, центральной нервной системы (ЦНС) или сердечно-сосудистой системы, таких как повреждение головного мозга, нейродегенеративное состояние или ишемия сердца.

#### **Заявление о правительственной поддержке**

Настоящее изобретение разработано при государственной поддержке в виде проекта NS093756, полученного от Национальных институтов здравоохранения (National Institutes of Health). Правительство имеет определенные права на настоящее изобретение.

#### **Уровень техники**

Повреждения головного мозга являются крайне распространенным заболеванием и одной из основных причин заболеваемости и смертности во всем мире. Головной мозг особенно подвержен повреждению, поскольку нейроны обладают ограниченной способностью к восстановлению. Когда человек рождается, в мозгу уже находятся практически все нейроны, которые у него будут на протяжении всей жизни. В отличие от других клеток в организме, нейроны перестают размножаться вскоре после рождения человека. Если эти клетки повреждены или умирают, то они не заменяются, и это зачастую может привести к потере когнитивных и сенсомоторных способностей человека или к их ухудшению, в значительной степени необратимому. Состояния, которые приводят к гибели и повреждению нервных клеток, варьируются от ишемических эпизодов (например, инсульт) и травм до дегенеративных расстройств (например, болезнь Альцгеймера).

Повреждение центральной нервной системы (ЦНС) является существенной причиной смерти и инвалидности во всем мире. Например, согласно данным Центра по контролю и профилактике заболеваний США (CDC), примерно 1,7 миллиона человек ежегодно получают черепно-мозговые травмы (ЧМТ), что с точки зрения расходов на медицинское обслуживание и снижения производительности обходится экономике США в более чем 60 миллиардов долларов в год (Finkelstein, E; Corso, P; Miller, T, The Incidence and Economic Burden of Injuries in the United States, Oxford University Press: New York, 2006). Кроме того, инсульт является третьей по значимости причиной смерти в США (по оценкам, число новых случаев составляет 795000 случаев в год) и основной причиной инвалидности, что обходится экономике США в более чем 34 миллиардов долларов в год (NINDS, 2014; stroke.nih.gov; и Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. "Heart disease and stroke statistics - 2015 update: a report from the American Heart Association," Circulation. 2015;e29-322). В критических условиях есть возможность оказывать помощь пациентам в течение 24 часов, что может ограничить степень повреждения. Сразу после ишемического или геморрагического инсульта участок мозга, пострадавший от инсульта, обычно содержит ядро ткани, которая необратимо повреждена, а также области жизнеспособной, но подверженной риску ткани, называемые периферическими отделами очага ишемии. В течение этого периода недостаточное снабжение клеток мозга кислородом и глюкозой приводит к дальнейшему вторичному повреждению периферических отделов очага ишемии. Недостаток кислорода и глюкозы снижает выработку энергии клеточными митохондриями. Немедленным эффектом этого снижения выработки энергии является отказ ионных насосов, в результате чего поднимаются внеклеточные ионы калия ( $K^+$ ), что приводит к появлению волн повторяющихся распространяющихся деполяризаций в ткани головного мозга. В то же время приток ионов натрия ( $Na^+$ ), а также хлорид-ионов ( $Cl^-$ ) в клетки приводит к набуханию клеток из-за повышения осмотического давления, при этом оказывается давление на близлежащие нейроны, что в конечном итоге приводит к лизису (разрыву клетки) и воспалительным реакциям. В целом, это нарушение ионного гомеостаза приводит к эксайтотоксичности, набуханию клеток и их гибели, что увеличивает повреждение соседних тканей и расширяет участки повреждения посредством вторичных механизмов. Существует потребность в эффективных способах лечения в течение первых 24 часов для защиты клеток мозга, подвергшихся стрессу. Повреждения мозга при инсульте распространяются так же, как и при других формах повреждений головного мозга, таких как травмы и сотрясение.

Помимо неотложного лечения, ключевую роль в более широкой нейрорепарации играет эффективная функция астроцитов: в течение периода времени 24-96 часов после инсульта головного мозга и в течение периода времени месяцы-годы у пациентов с нейродегенерацией, такой как болезнь Альцгеймера, или в самом общем случае у пожилых людей. Неспособность клеток мозга к регенерации требует реорганизации оставшейся неповрежденной мозговой ткани в попытке восстановить любую потерю функции. Эта способность мозговой реорганизации уменьшается у пожилых людей.

Предполагается, что рецепторы GPCR опосредуют кардиопротективные механизмы. Таким образом, существует возможность лечения заболеваний сердца и сердечно-сосудистых заболеваний при помощи аналогичных механизмов действия посредством модуляции этих рецепторов.

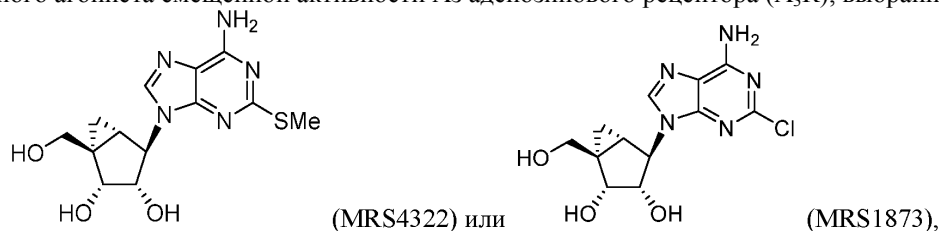
Существует острая неудовлетворенная потребность в более эффективных способах лечения повреждений головного мозга, повреждений ЦНС, заболеваний сердца и сердечно-сосудистых заболеваний и

связанных с ними состояний, а также потребность в усилении нейрорепарации у пациентов с нейродегенеративным заболеванием, таким как болезнь Альцгеймера.

#### Краткое описание изобретения

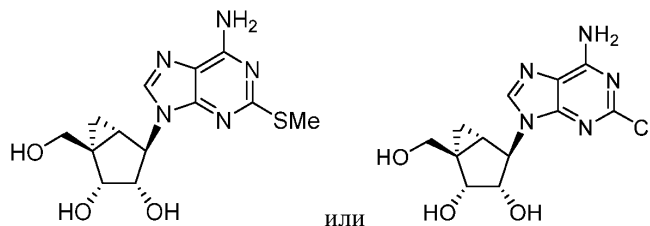
В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения повреждения, заболевания или состояния, выбранного из черепно-мозговой травмы (ЧМТ), инсульта, нейродегенеративного состояния, заболевания сердца или сердечно-сосудистого заболевания, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества агониста Аз аденозинового рецептора (A<sub>3</sub>R).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения повреждения, заболевания или состояния, выбранного из черепно-мозговой травмы (ЧМТ), инсульта, нейродегенеративного заболевания, заболевания сердца или сердечнососудистого заболевания, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества агониста смещенной активности, частичного агониста или частичного агониста смещенной активности Аз аденозинового рецептора (A<sub>3</sub>R), выбранного из:



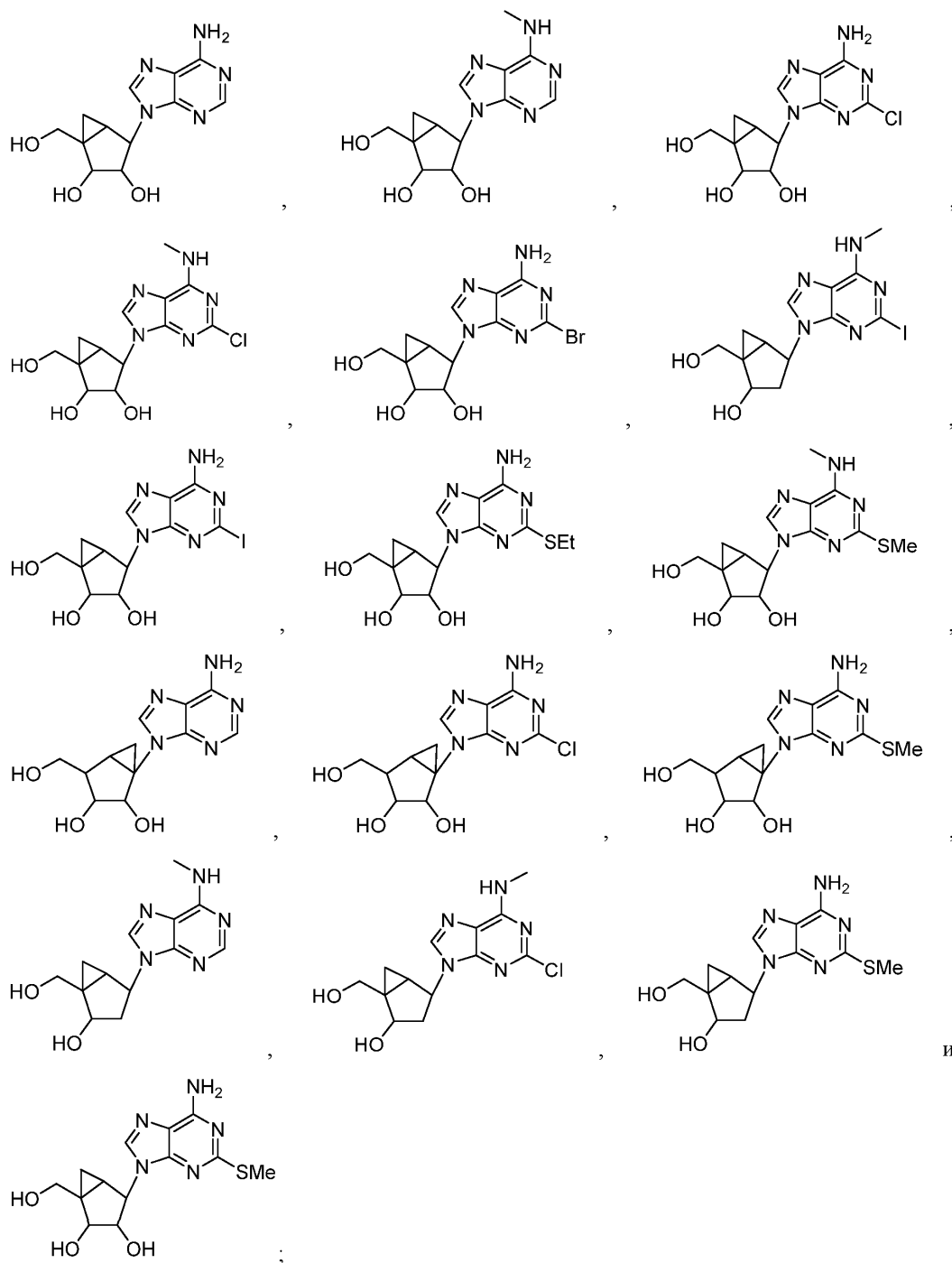
его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтически приемлемой композиции, содержащей указанное соединение.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения повреждения головного мозга или центральной нервной системы (ЦНС), выбранного из черепно-мозговой травмы (ЧМТ) или инсульта, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества соединения, выбранного из:



его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтически приемлемой композиции, содержащей указанное соединение.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к соединению, выбранному из группы, состоящей из:



где каждое соединение может иметь "северную" или "южную" конформацию, или метанокарбасакхар может быть заменен на D-рибосакхар; или его фармацевтически приемлемой соли; или его моно-, ди- или трифосфату или фармацевтически приемлемой соли указанного моно-, ди- или трифосфата. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или облегчения черепно-мозговой травмы (ЧМТ), поражения радиоактивным излучением, инсульта, мигрени, заболевания сердца, сердечно-сосудистого заболевания или нейродегенеративного заболевания, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или облегчения черепно-мозговой травмы (ЧМТ), поражения радиоактивным излучением, инсульта, мигрени, заболевания сердца, сердечно-сосудистого заболевания или нейродегенеративного заболевания, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества соединения, выбранного из: аденозина, АДФ, тринатриевой соли 2-метилтио-АДФ, АТФ, динатриевой соли АТФ,  $\alpha,\beta$ -метилден-АТФ,  $\alpha,\beta$ -метилденаденозин 5'-трифосфат тринатриевой соли, 2-метилтиоаденозин трифосфат тетранатриевой соли, 2-MeSATP, триэтилламмониевой соли VzATP, инозина, цитидина, ацилированных цитидинов, цитидина монофосфата (CMP), цитидина дифосфата (CDP), цитидина трифосфата (CTP), CDP-холина, CMP-холина, денуфосола

тетранатрия, GTP, ИТР, MRS 541, MRS 542, MRS 1760, MRS 2179, MRS 2279, MRS 2341, MRS 2365, MRS 2500, MRS 2690, MRS 2698, MRS 3558, MRS 4322, MRS 5151, MRS 5676, MRS 5678, MRS 5697, MRS 5698, MRS 5923, MRS 5930, бензил-NECA, IB-MECA, CI-IB-MECA, LJ529, DPMA, CCPA, DBXRM, HEMADO, PEMADO, HENECA, PENECA, CP608,039, CP532,903, CGS21680, AR132, VT72, VT158, VT160, VT163, PSB 0474, уридин-5'-дифосфата (УДФ), УДФ-глюкозы, уридин-β-тиодифосфата (УДФβS), уридин-5'-трифосфата (УТФ), уридин-γ-тиофосфата (УТФγS), тетранатриевой соли 2-тиоУТФ, тринатриевой соли УТФγS, уридин-5'-дифосфоглюкозы, диуридин-трифосфата, 2-(гексилтио)(НТ)-АМФ, диаденозина пентафосфата, 2'-дезоксид-2'-амино-УТФ, 2-тио-УТФ, триацетилуридина, диацетил/ацил-уридина, уридина, сурамина, аналогов дипиридамола, диаденозинтетрафосфата Ar<sub>4</sub>U, Ar<sub>4</sub>A, INS365, INS37217 или INS48823; при этом каждый сахар может быть заменен метанокарба-сахаром в "северной" или "южной" конформации или каждый сахар может быть заменен D-рибосахаром; или его фармацевтически приемлемой соли.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1А показаны профили концентрация-время для MRS4322 в плазме и головном мозге мышей после внутрибрюшинного введения. На фиг. 1В показаны профили концентрация-время для MRS4322 в плазме и внутриклеточной жидкости мозга новорожденных поросят после внутривенного введения.

На фиг. 2 показаны профили концентрация-время для MRS4322 в плазме и головном мозге мышей после внутрибрюшинного введения MRS2365.

На фиг. 3 показана стабильность MRS2365 *in vitro* в плазме мыши после обработки ЭДТА.

На фиг. 4 показана стабильность MRS2365 *in vitro* в плазме человека после обработки ЭДТА.

На фиг. 5 показана стабильность MRS2365 *in vitro* в цельной крови мыши после обработки ЭДТА.

На фиг. 6 показана стабильность MRS2365 *in vitro* в цельной крови человека после обработки ЭДТА.

На фиг. 7 показана стабильность MRS2365 *in vitro* в плазме мыши после обработки гепарином и ЭДТА в течение 90-секундного инкубационного периода.

На фиг. 8 показана стабильность MRS2365 *in vitro* в плазме человека после обработки гепарином и ЭДТА в течение 90-секундного инкубационного периода.

На фиг. 9 показаны хроматограммы ионов ЖХ/МС/МС с регистрацией положительных ионов и спектры ионов метаболитов MRS2365 в гепаринизированной плазме человека после 30-минутной инкубации.

На фиг. 10 показаны хроматограммы ионов ЖХ/МС/МС с регистрацией положительных ионов и спектры ионов MRS2365 в гепаринизированной цельной крови человека после 30-минутной инкубации.

На фиг. 11 представлена схема, представляющая метаболиты MRS2365, обнаруженные с помощью ЖХ/МС/МС с регистрацией положительных и отрицательных ионов в гепаринизированной плазме и цельной крови человека. Два метаболита MRS2365 наблюдались после инкубации при 100 мкМ в цельной крови и плазме человека (литий-гепарин в качестве антикоагулянта): M2, идентифицированный как частично дефосфорилированный метаболит MRS2365 (т.е. с одной оставшейся фосфатной группой, MRS2347); и M1, идентифицированный как полностью дефосфорилированный метаболит MRS2365 (т.е. MRS4322).

На фиг. 12А-Д показаны результаты лечения мышей, подвергшихся воздействию ЧМТ или симуляции (контрольный эксперимент) при помощи MRS4322, CI-IB-MECA и MRS2365. ЧМТ обычно вызывает увеличение экспрессии GFAP. Мышей подвергали симуляции или ЧМТ (на ипсилатеральной стороне головного мозга) и мыши получали лечение, обозначенное как через 30 минут после ЧМТ. Через 7 дней после травмы у мышей забирали плазму крови, затем мышей умерщвляли для получения гомогенатов головного мозга из ипсилатеральных ("Ipsi") и контралатеральных ("Cntr") полушарий (средняя треть). Вестерн-блоттинг нормализовали к актину. (фиг. 12А и 12С) Показаны представительные блоты для ипсилатеральных гомогенатов головного мозга и плазмы на 7 день. Введение MRS4322 или MRS2365 снижало уровни экспрессии GFAP в мозге у мышей, подвергшихся ЧМТ. (фиг. 12В и 12D) Данные были собраны в ходе 3 различных экспериментов (N = количество мышей, получавших лечение) и изображены в виде гистограмм, показанных как среднее значение контроля ± SEM (стандартная погрешность среднего). \*p < 0,05 и \*\*p < 0,01 от ЧМТ без лечения (красная полоса).

На фиг. 13А-Д показаны результаты экспериментов с инфарктом, вызванным фототромбозом, и последствия введения MRS4322 и/или специфического антагониста рецептора аденозина типа A<sub>3</sub> MRS1523. MRS4322 уменьшал последствия инсульта, а MRS1523 обращал эти последствия вспять, (фиг. 13А) Корональные срезы мозга мыши (каждая группа срезов - от одной мыши) после инсульта фототромбозом в носителе (инъекционный физиологический раствор) и у мышей, обработанных при помощи MRS4322 и MRS2365, как обозначено. Мыши с инсультом получали носитель или лечение (инъекции внутрибрюшинно (IP)) в течение 30 минут после ишемии. Затем мышей умерщвляли через 24 часа после инсульта, их мозг удаляли, разрезали и окрашивали TTC. (фиг. 13В). Корональные срезы у инсультных мышей, которым предварительно инъекцировали антагонист рецептора A<sub>3</sub> MRS1523. (фиг. 13С) Промаркированы средние TTC-окрашенные объемы инсульта для MRS4322, MRS2365, MRS5698 и CI-IB-MECA. (фиг. 13D).

Объемы инсульта у мышей, предварительно обработанных антагонистом рецептора  $A_3$  MRS1523, как указано. Данные собраны по 2 экспериментам ( $N$  = количество мышей, получивших лечение) и изображены в виде среднего  $\pm$  SEM (стандартная погрешность среднего). \*\*  $p < 0,01$  и \*\*\* $p < 0,001$ .

На фиг. 14А-В показаны результаты экспериментов по инсульту, вызванному фототромбозом, и результаты применения MRS4322, MRS1873 или носителя. MRS4322 и MRS1873 уменьшают инсульты, вызванные фототромбозом. (фиг. 14А). Корональные срезы мозга с поражением фототромбозом в носителе (инъекция физиологического раствора) и у мышей, получавших лечение, MRS4322 и MRS1873, как отмечено. Мыши с инсультом получали носитель или лечение (инъекции внутривенно (IP)) в течение 30 минут после ишемии. Затем мышей умерщвляли через 24 часа после инсульта, их мозг удаляли, разрезали и окрашивали TTC. (фиг. 14В) Обозначены средние TTC-окрашенные объемы инсульта. Данные собраны по 3 экспериментам ( $N$  = количество мышей, получавших лечение) и изображены в виде среднего  $\pm$  SEM (стандартная погрешность среднего). \*\*  $p < 0,01$ .

На фиг. 15 показаны структуры конкретных соединений, подходящих для применения в настоящем изобретении.

На фиг. 16 показаны профили концентрация-время для MRS4322 в мозге и спинномозговой жидкости новорожденных поросят после внутривенного введения. После внутривенного введения новорожденным поросьятам определяли концентрации MRS4322 в образцах плазмы, головного мозга, внеклеточной жидкости головного мозга и спинномозговой жидкости.

На фиг. 17 показаны результаты экспериментов по конкурентному связыванию MRS4322 по сравнению с радиолигандом агонистом  $A_3$  [ $^3H$ ]NECA (10 нМ) на рецепторах  $A_3$  человека, экспрессируемых в клетках CHO. Расчетное значение  $K_i$  для MRS4322 составляло  $1490 \pm 410$  нМ.

На фиг. 18 показаны результаты экспериментов по конкурентному связыванию MRS4322 по сравнению с радиолигандом агонистом  $A_3$  [ $^3H$ ]NECA (10 нМ) на рецепторах  $A_3$  мыши, экспрессируемых в клетках CHO. Расчетное значение  $K_i$  для MRS4322 составляло  $4940 \pm 974$  нМ.

На фиг. 19 показаны результаты экспериментов по аккумуляции цАМФ для MRS4322 и NECA на рецепторах  $A_3$  человека, экспрессированных в клетках CHO.

Расчетное значение  $EC_{50}$  для MRS4322 составляло  $3630 \pm 370$  нМ; для NECA было определено значение  $EC_{50}$   $41,8 \pm 6,3$  нМ.

На фиг. 20 показаны результаты экспериментов по аккумуляции цАМФ для MRS4322 и NECA на рецепторах  $A_3$  мыши, экспрессированных в клетках CHO. Расчетное значение  $EC_{50}$  для MRS4322 составляло  $759 \pm 170$  нМ; для NECA было определено значение  $EC_{50}$   $6,85 \pm 0,88$  нМ.

#### **Подробное описание конкретных вариантов реализации изобретения**

1. Повреждения и состояния головного мозга, ЦНС, сердечно-сосудистые и другие повреждения и состояния.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен новый подход к предотвращению и/или лечению повреждения головного мозга, связанного с острой травмой головного мозга, а также с более продолжительными заболеваниями головного мозга и ЦНС, а также с заболеваниями и состояниями сердца и сердечнососудистой системы. В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения таких повреждений, заболеваний и состояний с вовлечением нейропротективных и нейрорепаративных эффектов, опосредованных астроцитами, которые теперь понимаются как ключевая клетка, заботящаяся о нейронах, а также митохондриями астроцитов, которые обеспечивают значительную часть энергии мозга. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения таких повреждений, заболеваний и состояний с помощью кардиопротективных и регенеративных эффектов, опосредованных рецепторами  $A_3R$ . Что касается нейропротективных и нейрорепаративных эффектов, то, без ограничения какой-либо теорией, считается, что селективное усиление энергетического метаболизма астроцитов, опосредованное рецепторами  $A_3R$  и/или  $P2Y_1$ , способствует усилению функций астроцитов, таких как их нейропротективные и нейрорепаративные функции, в свою очередь, повышая устойчивость нейронов и других клеток как к острым повреждениям, так и к длительным стрессам. В некоторых случаях может быть полезно обеспечить смещенную активность, то есть селективную или предпочтительную, одного или более путей, опосредованных рецепторами  $A_3R$  и/или  $P2Y_1$ , где один или более нежелательных путей не активированы или активированы в меньшей степени. В дополнение к астроцитам или в качестве их альтернативы может быть активирована нейропротективная или нейрорепаративная функция глии, микроглии, нейронов, клеток эндотелия и других типов клеток мозга и/или ЦНС. Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к соединениям и способам их применения для лечения, облегчения или ускорения восстановления от конкретных состояний мозга или центральной нервной системы (ЦНС), таких как повреждения головного мозга, например, путем усиления нейропротективных и/или нейрорепаративных эффектов, опосредованных астроцитами, глией, микроглией, нейронами, клетками эндотелия или другими клетками головного мозга и/или ЦНС, включающим введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению.

Астроциты играют ключевую роль в поддержке и защите нейронов, и они оказывают очень важное влияние на исход травм головного мозга, которые вызывают повреждение головного мозга, например,

ишемические травмы. Центральная роль самих астроцитарных митохондрий в этих функциях мозга недооценивается. Например, ингибирование митохондрий астроцитов увеличивает отек и приводит к некротической гибели клеток. Нейроны необратимо повреждаются в результате повторяющейся распространяющейся деполяризации только в том случае, если нарушается митохондриальная функция астроцитов, и митохондрии астроцитов необходимы для уменьшения патофизиологических повышений внеклеточного  $K^+$ , инициирующих распространение деполяризации. Активация пуринергических рецепторов на астроцитах приводит к увеличению митохондриального  $Ca^{2+}$ , что улучшает функцию цикла митохондриальной лимонной кислоты и увеличивает дыхание и выработку АТФ. Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к обнаружению того, что активация пуринергических рецепторов астроцитов усиливает сигнальные пути выживания клеток мозга, обеспечивая жизнеспособность как астроцитов, так и нейронов во время окислительного стресса. Кроме того, активированные астроциты генерируют и поставляют восстановленный глутатион, ключевой антиоксидант, который способствует устойчивости астроцитов и нейронов к окислительному стрессу. Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу модулирования пуринергических рецепторов астроцитов со стимулированием выживания и жизнеспособности одного или нескольких типов клеток в мозге пациента после окислительного стресса, такого как окислительный стресс, вызванный повреждением головного мозга, ишемией-реперфузией или нейродегенеративным состоянием, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, соединения согласно настоящему изобретению.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения активация астроцитов достигается за счет приведения соединения согласно настоящему изобретению в контакт с одним или более пуринергическими рецепторами, такими как аденозиновые рецепторы (AR), например, такими, которые связаны с астроцитами или экспрессируются астроцитами, с модулированием таким образом активности одного или более рецепторов. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения за счет воздействия на аденозиновые рецепторы, такие как  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  и  $A_3$  на астроцитах, указанное соединение активирует астроциты для лечения одного или более описанных в настоящем документе заболеваний или состояний. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения после введения пациенту, нуждающемуся в этом, соединение согласно настоящему изобретению влияет на одну или несколько функций, таких как поглощение глутамата, реактивный глиоз, отек и высвобождение нейротрофических и нейротоксических факторов, влияющих на метаболический стресс и его последствия, с лечением таким образом одного или более заболевания или состояния. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист AR. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанный пуринергический рецептор представляет собой  $A_3$  аденозиновый рецептор ( $A_3P$ ). В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист  $A_3R$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой частичный агонист, агонист смещенной активности или частичный агонист смещенной активности на  $A_3$  рецепторе ( $A_3R$ ), такие как рецептор  $A_3$  человека ( $hA_3R$ ). В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист со смещенной активностью рецептора  $A_3R$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой MRS4322 или MRS1873 или их фармацевтически приемлемую соль.

Рецепторы  $P2Y$  представляют собой рецепторы, сопряженные с G-белком, и различные подтипы этих рецепторов играют важную роль в таких процессах, как синаптическая связь, клеточная дифференциация, ионный поток, расширение кровеносных сосудов, проницаемость гематоэнцефалического барьера, агрегация тромбоцитов и нейромодуляция. Характеризуемые члены семейства пуринергических рецепторов  $P2Y$  включают рецепторы  $P2Y_1$  млекопитающих, рецепторы  $P2Y_{11}$ ,  $P2Y_{12}$  и  $P2Y_{13}$ , которые связываются с аденозиновыми нуклеотидами; рецепторы  $P2Y_4$ ,  $P2Y_6$  и  $P2Y_{14}$ , которые связываются с урациловыми нуклеотидами; и рецепторы  $P2Y_2$  и рецепторы  $P2Y_4$  грызунов, которые имеют смешанную селективность. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения активация астроцитов достигается за счет приведения соединения согласно настоящему изобретению в контакт с одним или более пуринергическими рецепторами, такими как рецепторы  $P2Y$ , например, такими, которые связаны с астроцитами или экспрессируются астроцитами, с модулированием таким образом активности одного или более рецепторов. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения за счет воздействия на рецепторы  $P2Y$ , такие как рецепторы  $P2Y_1$ ,  $P2Y_{11}$ ,  $P2Y_{12}$  и  $P2Y_{13}$ , которые связаны с астроцитами или экспрессируются астроцитами, указанное соединение активирует астроциты для лечения одного или более описанных в настоящем документе заболеваний или состояний. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанный рецептор  $P2Y$  представляет собой рецептор  $P2Y_1$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанный рецептор  $P2Y_1$  расположен на внутриклеточных мембранах митохондрий. В одном варианте реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист  $P2Y$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист  $P2Y_1$ , например, на рецепторе  $P2Y_1$  человека. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности рецептора  $P2Y_1$ , такого как рецептор  $P2Y_1$  человека. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное со-

единение представляет собой агонист со смещенной активностью рецептора P2Y<sub>1</sub>. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой MRS4322 или его фармацевтически приемлемую соль. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или облегчения повреждения головного мозга, такого как повреждение головного мозга, вызванного ЧМТ или прогрессирующим нейродегенеративным расстройством, у нуждающегося в этом пациента, включающему введение указанному пациенту эффективного количества соединения, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанный субъект перенес ЧМТ, сотрясение мозга, инсульт, частичную или полную перерезку спинного мозга или недоедание. В других вариантах реализации настоящего изобретения указанный субъект перенес токсические невропатии, менингоэнцефалопатии, нейродегенерацию, вызванную генетическим расстройством, возрастную нейродегенерацию или сосудистое заболевание; или другое заболевание, описанное в патенте США 8691775, полное содержание включено в данное описание посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретение относится к способу лечения или облегчения повреждения головного мозга, такого как повреждение головного мозга, вызванного ЧМТ или прогрессирующим нейродегенеративным расстройством, у нуждающегося в этом пациента, включающему введение указанному пациенту эффективного количества агониста A<sub>3</sub>R. В других вариантах реализации настоящего изобретение относится к способу лечения или облегчения повреждения головного мозга, такого как повреждение головного мозга, вызванного ЧМТ или прогрессирующим нейродегенеративным расстройством, у нуждающегося в этом пациента, включающему введение указанному пациенту эффективного количества агониста P2Y<sub>1</sub>. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности рецептора A<sub>3</sub>. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора P2Y<sub>1</sub>. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой MRS4322 или MRS1873 или их фармацевтически приемлемую соль.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу стимулирования опосредованной астроцитами нейропротекции или нейрорепарации у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение пациенту эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения относится к способу стимулирования опосредованной астроцитами нейропротекции или нейрорепарации у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение пациенту эффективного количества агониста A<sub>3</sub>R. В других вариантах реализации настоящего изобретения относится к способу стимулирования опосредованной астроцитами нейропротекции или нейрорепарации у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение пациенту эффективного количества агониста P2Y<sub>1</sub>. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора A<sub>3</sub>. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора P2Y<sub>1</sub>. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой MRS4322 или MRS1873 или их фармацевтически приемлемую соль. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу стимулирования выживания нейронов, глиальных клеток, эндотелиальных клеток или других клеток мозга, таких как клетки, находящиеся в периферических отделах очага ишемии, у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение пациенту эффективного количества соединения, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения относится к способу стимулирования выживания нейронов, глиальных клеток или других клеток мозга, таких как клетки, находящиеся в периферических отделах очага ишемии, у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение пациенту эффективного количества агониста A<sub>3</sub>R. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения относится к способу стимулирования выживания нейронов, глиальных клеток, эндотелиальных клеток или других клеток мозга, таких как клетки, находящиеся в периферических отделах очага ишемии, у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение пациенту эффективного количества агониста P2Y<sub>1</sub>. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора A<sub>3</sub>. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора P2Y<sub>1</sub>. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой MRS4322 или MRS1873 или их фармацевтически приемлемую соль.

В других вариантах реализации настоящего изобретения указанный пациент имеет травму головного мозга, такую как указанные ниже, или имеет риск ее получить. Соответственно, также предложены способы лечения состояний, описанных ниже.



Черепно-мозговые травмы.

Черепно-мозговые травмы (ЧМТ) являются крайне болезненным состоянием и, по прогнозам, к 2020 году станут третьей основной причиной глобальной заболеваемости и смертности. Не существует утвержденных методов лечения ЧМТ, и большинство пациентов с ЧМТ выписываются из больницы без фармакологического лечения (Witt 2006). Повторяющаяся ЧМТ, такая как сотрясение мозга, может вызывать возрастную нейродегенерацию, которая через несколько десятков лет приводит к ряду симптомов и инвалидности (McKee 2013). ЧМТ могут возникать из-за спортивных травм, дорожно-транспортных происшествий, падений, взрывных ударов, нападений и т.д. Травмы широко варьируются по своей сложности и тяжести: от "легких" сотрясений мозга с кратковременными изменениями психического статуса, когнитивными затруднениями или потерей сознания до "тяжелых" с длительными периодами потери сознания и/или амнезии после повреждения. В США ежегодно примерно 1,7 миллиона человек получают травмы, приводящие к ЧМТ, и обращаются за медицинской помощью (Университет Калифорнии, Сан-Франциско и Государственный центр санитарно-эпидемиологического надзора США), и, по оценкам Государственного центра санитарно-эпидемиологического надзора США, ежегодно от 1,6 до 3,8 миллиона случаев сотрясения мозга происходят во время спортивных и других развлекательных мероприятий, после которых человек не обращается в больницу или отделение неотложной помощи. (Государственный центр санитарно-эпидемиологического надзора США; Langlois 2006). Приблизительно 5-10% спортсменов получают сотрясение мозга в каждом спортивном сезоне. (Sports Concussion Institute 2012) Американский футбол - это спорт с самым высоким риском сотрясения мозга для мужчин (вероятность сотрясения мозга 75%), в то время как у футбола самый высокий риск сотрясения мозга для женщин (вероятность сотрясения мозга 50%). ЧМТ является основной причиной смерти и инвалидности среди детей и молодежи (Государственный центр санитарно-эпидемиологического надзора США) и наиболее часто получаемой травмой военного характера; примерно 20% военнослужащих США с 2003 года получили по крайней мере одну ЧМТ. (Chronic Effects of Neurotrauma Consortium (CENC); Warden 2006; Scholten 2012; Taylor 2012; Gavett 2011; Guskiewicz 2005; Omalu 2005) Общие косвенные и прямые медицинские расходы, связанные с ЧМТ, оцениваются в 77 миллиардов долларов в год (Университет Калифорнии, Сан-Франциско и Государственный центр санитарно-эпидемиологического надзора США). По меньшей мере 5 миллионов американцев нуждаются в постоянной ежедневной поддержке при осуществлении повседневной деятельности в результате ЧМТ (Государственный центр санитарно-эпидемиологического надзора США и Thurman 1999).

Активация астроцитов согласно настоящему изобретению представляет собой новый вариант лечения таких состояний. Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения ЧМТ или ускорения восстановления после ЧМТ, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанная ЧМТ выбрана из травматических повреждений головного мозга (таких как сотрясение мозга, повреждение взрывной волной, повреждение, полученное при участии в боевых действиях) или спинного мозга (таких как частичная или полная перерезка спинного мозга). В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения ЧМТ является результатом легкого, умеренного или сильного удара по голове, включает в себя открытую или закрытую рану головы или является результатом проникающего или непроникающего удара по голове. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения относится к способу лечения ЧМТ или ускорения восстановления после ЧМТ, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества агониста  $A_3R$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения относится к способу лечения ЧМТ или ускорения восстановления после ЧМТ, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества агониста  $P2Y_1$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора  $A_3$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора  $P2Y_1$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой MRS4322 или MRS1873 или их фармацевтически приемлемую соль.

Инсульт.

Инсульт возникает тогда, когда кровеносный сосуд, переносящий кислород и питательные вещества к мозгу, оказывается заблокирован в результате ишемической блокировки или из-за геморрагического разрыва кровеносного сосуда в головном мозге, что вызывает смерть нейронов, глии и эндотелиальных клеток в разрушенной области головного мозга. Исход инсульта зависит от места и степени повреждения, и последствия этого повреждения наблюдаются в функциях организма, регулируемых поврежденной областью мозга. Инсульт может привести к одностороннему или двустороннему параличу, нарушениям речи и языка, потере памяти, поведенческим изменениям и даже смерти. Инсульт является четвертой по значимости причиной смерти в Соединенных Штатах и основной причиной инвалидности среди взрослых. Каждый год примерно у 800000 человек впервые или повторно случается инсульт. Каждый день у более чем 2000 американцев случается инсульт, в результате которого более 400 человек погибает. На инсульт приходилось примерно 1 из каждых 19 смертей в Соединенных Штатах в 2010 году. По

оценкам, 6,8 миллиона американцев в возрасте  $\leq 20$  лет перенесли инсульт. (AHA and Go 2014). По состоянию на 2010 год ежегодные прямые и косвенные затраты на инсульт оценивались в 36,5 млрд. долларов США. В течение нескольких минут после инсульта отсутствие кровотока навсегда повреждает участок мозговой ткани (ядро). Между этим ядром поврежденной ткани и нормальной мозговой тканью находятся области, известные как периферические отделы очага ишемии - ткань, которая подвергается постепенному стрессу из-за ослабленного кровотока и некоторого нарушения энергетического обмена. В течение первых 24-48 часов после инсульта стресс нейрональных и глиальных клеток в периферических отделах очага ишемии приводит либо к некоторому выздоровлению, либо к дальнейшей гибели клеток.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу нейропротективной терапии у пациента с инсультом, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения такая терапия позволяет сохранить как можно большую часть периферических отделов очага ишемии и/или ограничивает дальнейшее острое повреждение ткани и/или способствует восстановлению нейронов. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения инсульта или ускорения восстановления после инсульта, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения инсульта или ускорения восстановления после инсульта, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества агониста  $A_3R$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора  $A_3$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора  $P2Y_1$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой MRS4322 или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанный инсульт выбран из ишемического инсульта, геморрагического инсульта, субарахноидального кровоизлияния, спазма сосудов головного мозга или преходящих нарушений мозгового кровообращения (ПНМК). В некоторых вариантах реализации настоящего описания указанный инсульт представляет собой ишемический инсульт. В некоторых вариантах реализации настоящего описания указанный инсульт представляет собой геморрагический инсульт. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят в течение 48 часов после инсульта. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят в течение 24 часов после инсульта. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят в течение 16 часов после инсульта. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят в течение 8, 4, 2 часов или 1 часа после инсульта. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят в течение по меньшей мере первых 1-72 часов после инсульта. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят в течение по меньшей мере первых 8-52 часов после инсульта. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят в течение по меньшей мере первых 8-48 часов после инсульта. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят в течение по меньшей мере первых 24-48 часов после инсульта. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят длительно для лечения инсульта по мере его возникновения. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят длительно для лечения преходящих нарушений мозгового кровообращения (ПНМК).

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят длительно для лечения ишемического инсульта, геморрагического инсульта, субарахноидального кровоизлияния, спазма сосудов головного мозга, преходящих нарушений мозгового кровообращения (ПНМК) или для лечения пациента с повышенным риском развития инсульта, такого как пациент, у которого был инсульт в прошлом и который подвергается риску дальнейшего инсульта, например, пациент старше 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80 лет.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение лечит ишемически-реперфузионное повреждение, вызванное инсультом.

Непродегенеративные заболевания.

Нейродегенеративные заболевания представляют собой неизлечимые, прогрессирующие и, в конечном итоге, изнуряющие синдромы, возникающие в результате прогрессирующей дегенерации и/или гибели нейронов в головном и спинном мозге. Нейродегенерация приводит к расстройствам двигательной (атаксия) и/или когнитивной функций (деменция) и включает в себя спектр заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Паркинсона (БП), болезнь Хантингтона (БХ), рассеянный склероз (РС), боковой амиотрофический склероз (БАС) и хроническая травматическая энцефалопатия (ХТЭ).

Хотя многие нейродегенеративные заболевания имеют в основном генетическое происхождение, они также могут возникать и по другим причинам, среди которых вирусы, алкоголизм, опухоли или токсины и, как теперь ясно, повторяющиеся повреждения головного мозга.

Нейроны накапливают клеточные повреждения с течением времени из-за вышеупомянутых факторов, что обычно считается причиной, по которой многие нейродегенеративные заболевания, связанные с длительным клеточным стрессом, такие как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, встречаются у пожилых людей. Деменции представляют собой преобладающий исход нейродегенеративных заболеваний, при этом примерно 60-70% случаев относится к БА. (Kandale 2013). Как обсуждалось выше, активация нейропротективных и нейрорепаративных механизмов может уменьшить прогрессирование одного или нескольких нейродегенеративных заболеваний. Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения нейродегенеративного заболевания или ускорения восстановления после нейродегенеративного заболевания, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению. В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу стимулирования нейропротекции или нейрорепарации у пациента, страдающего нейродегенеративным заболеванием, включающему введение пациенту эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен способ стимулирования нейропротекции или нейрорепарации у пациента, страдающего нейродегенеративным заболеванием, включающий введение пациенту эффективного количества агониста  $A_3R$ . В других вариантах реализации настоящего изобретения предложен способ стимулирования нейропротекции или нейрорепарации у пациента, страдающего нейродегенеративным заболеванием, включающий введение пациенту эффективного количества агониста  $P2Y_1$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора  $A_3$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора  $P2Y_1$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой MRS4322 или его фармацевтически приемлемую соль.

Болезнь Альцгеймера (БА).

В 2014 году в США было примерно 5,2 миллиона человек всех возрастов с болезнью Альцгеймера; 11% населения в возрасте 65 лет и старше страдают БА. (Ассоциация по борьбе с болезнью Альцгеймера, Alzheimer's Association) По прогнозам, к 2050 году количество людей в возрасте 65 лет и старше с БА увеличится почти в три раза и достигнет 13,8 миллионов. В США стоимость оказания помощи пациентам с БА составляет примерно 214 миллиардов долларов в год; 70% этой стоимости покрываются федеральной программой медицинской помощи престарелым (Medicare) и программой государственной льготной медицинской помощи (Medicaid). Согласно нынешним тенденциям, к 2050 году эти расходы возрастут до 1,2 триллиона долларов в год.

Новый вариант лечения БА заключается в активации астроцитов и стимулировании нейропротекции и нейрорепарации в соответствии с настоящим изобретением. Соответственно, в одном варианте реализации настоящего изобретения предложен способ лечения БА или стимулирования нейропротекции или нейрорепарации у пациента, страдающего БА, включающий введение пациенту эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен способ лечения БА или стимулирования нейропротекции или нейрорепарации у пациента, страдающего БА, включающий введение пациенту эффективного количества агониста  $A_3R$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен способ лечения БА или стимулирования нейропротекции или нейрорепарации у пациента, страдающего БА, включающий введение пациенту эффективного количества агониста  $P2Y_1$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора  $A_3$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора  $P2Y_1$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой MRS4322 или его фармацевтически приемлемую соль.

Болезнь Паркинсона (БП).

Миллион американцев живут с БП, и каждый год примерно БП диагностируют у примерно 60000 американцев, не считая тысяч случаев, которые остаются незамеченными.

(Фонд Болезни Паркинсона) общая сумма прямых и косвенных расходов на БП, включая лечение, выплаты по социальному обеспечению и потерю дохода, в Соединенных Штатах оценивается примерно в 25 миллиардов долларов в год. (Фонд Болезни Паркинсона и Huse 2005).

Активация нейропротекции и нейрорепарации в соответствии с настоящим изобретением представляет собой новый вариант лечения БП. Соответственно, в одном варианте реализации настоящего изобретения предложен способ лечения БП или стимулирования нейропротекции или нейрорепарации у пациента, страдающего БП, включающий введение пациенту эффективного количества соединения со-

гласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен способ лечения БП или стимулирования нейропротекции или нейрорепарации у пациента, страдающего БП, включающий введение пациенту эффективного количества агониста  $A_3R$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен способ лечения БП или стимулирования нейропротекции или нейрорепарации у пациента, страдающего БП, включающий введение пациенту эффективного количества агониста  $P2Y_1$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора  $A_3$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора  $P2Y_1$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой MRS4322 или MRS1873 или их фармацевтически приемлемую соль.

Рассеянный склероз (РС).

Более 400000 человек в Соединенных Штатах страдают рассеянным склерозом. У молодых людей РС представляет собой наиболее распространенное заболевание центральной нервной системы. (Multiple Sclerosis Foundation) Астроциты способны обратить вспять разрушение миелиновых оболочек нервных клеток, которое вызвано рассеянным склерозом, благодаря своему нейрорепаративному действию и ускорению заживления в поврежденной ЦНС пациентов с РС.

Активация нейропротекции и нейрорепарации в ЦНС в соответствии с настоящим изобретением представляет собой новый вариант лечения РС. Соответственно, в одном варианте реализации настоящего изобретения предложен способ лечения РС или стимулирования нейропротекции или нейрорепарации у пациента, страдающего РС, включающий введение пациенту эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен способ лечения РС или стимулирования нейропротекции или нейрорепарации у пациента, страдающего РС, включающий введение пациенту эффективного количества агониста  $A_3R$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен способ лечения РС или стимулирования нейропротекции или нейрорепарации у пациента, страдающего РС, включающий введение пациенту эффективного количества агониста  $P2Y_1$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора  $A_3$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора  $P2Y_1$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой MRS4322 или MRS1873 или их фармацевтически приемлемую соль.

Боковой амиотрофический склероз (БАС)/болезнь Лу Герига.

Приблизительно у 5600 человек в США ежегодно диагностируется БАС; при этом в настоящее время 30000 американцев могут страдать от данного заболевания. (ALS Association) Активация астроцитов может обеспечить стимуляцию оздоровления и восстановления нейронов и их соединений у пациента с БАС.

Соответственно, в одном варианте реализации настоящего изобретения предложен способ лечения БАС или стимулирования нейропротекции или нейрорепарации у пациента, страдающего БАС, включающий введение пациенту эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению. В других вариантах реализации настоящего изобретения также предложен способ стимулирования оздоровления и восстановления нейронов и их соединений у пациента с БАС, включающий введение пациенту эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен способ лечения БАС или стимулирования нейропротекции или нейрорепарации у пациента, страдающего БАС, включающий введение пациенту эффективного количества агониста  $A_3R$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен способ лечения БАС или стимулирования нейропротекции или нейрорепарации у пациента, страдающего БАС, включающий введение пациенту эффективного количества агониста  $P2Y_1$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора  $A_3$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора  $P2Y_1$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой MRS4322 или его фармацевтически приемлемую соль.

Хроническая травматическая энцефалопатия (ХТЭ).

ХТЭ (форма таупатии) - это прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, встречающееся у людей, которые перенесли один или более (часто многократных) или повторяющихся в течение времени) тяжелых ударов по голове. ХТЭ чаще всего диагностируется у профессиональных спортсменов, занимающихся американским футболом, футболом, хоккеем, профессиональным реслингом, трюковыми выступлениями, ездой на быках, родео, мотокроссом и другими контактными видами спорта, которые пе-

ренесли травму головного мозга и/или повторные сотрясения мозга. Подгруппа страдающих ХТЭ имеет хроническую травматическую энцефаломиопатию (ХТЭМ), которая характеризуется симптомами заболевания двигательных нейронов и имитирует БАС. Считается, что прогрессирующая мышечная слабость, двигательные нарушения и нарушения походки являются ранними признаками ХТЭМ. Симптомы первой стадии ХТЭ включают прогрессирующий дефицит внимания, дезориентацию, головокружение и головные боли. Симптомы второй стадии включают потерю памяти, социальную нестабильность, неустойчивое поведение и неспособность здраво рассуждать. На третьей и четвертой стадиях пациенты страдают от прогрессирующей деменции, замедленных движений, тремора, гипомимии, вертиго, нарушений речи, потери слуха, суицидальности; и возможно также от дизартрии, дисфагии и глазных аномалий, например, птоза.

Соответственно, в одном варианте реализации настоящего изобретения предложен способ лечения или предотвращения ХТЭ или стимулирования нейропротекции или нейрорепарации у пациента, страдающего ХТЭ, включающий введение пациенту эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению. В других вариантах реализации настоящего изобретения также предложен способ стимулирования оздоровления и восстановления нейронов и их соединений у пациента с ХТЭ, включающий введение пациенту эффективного количества согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение лечит один или более симптомов ХТЭ первой стадии, второй стадии, третьей стадии или четвертой стадии. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен способ лечения ХТЭ или стимулирования нейропротекции или нейрорепарации у пациента, страдающего ХТЭ, включающий введение пациенту эффективного количества агониста  $A_3R$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен способ лечения ХТЭ или стимулирования нейропротекции или нейрорепарации у пациента, страдающего ХТЭ, включающий введение пациенту эффективного количества агониста  $P2Y_1$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора  $A_3$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора  $P2Y_1$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой MRS4322 или MRS1873 или их фармацевтически приемлемую соль.

В микроскопическом масштабе патология включает гибель нейронов, отложение тау-белка, отложение бета-амилоида TAR ДНК-связывающего белка 43 (TDP 43), изменения белого вещества и другие аномалии. Отложение тау включает увеличивающееся присутствие плотных нейрофибриллярных клубков (NFT), нейритов и глиальных клубков, которые состоят из астроцитов и других глиальных клеток. Таким образом, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанный способ лечит, улучшает клиренс или предотвращает гибель нейронов, отложение тау, отложение бета-амилоида TAR ДНК-связывающего белка 43 (TDP 43), изменения белого вещества и другие аномалии, связанные с ХТЭ.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения относится к длительному введению соединения согласно настоящему изобретению, такого как агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности  $A_3R$ , или агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности  $P2Y_1$ , для лечения нейродегенеративного заболевания, такого как заболевания, описанные выше и ниже в настоящем документе.

Сердечно-сосудистые заболевания.

Соединения, описанные в настоящем документе, также полезны для лечения различных сердечно-сосудистых заболеваний и состояний. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения относится к способу лечения заболевания сердца или сердечно-сосудистого заболевания, такого как ишемия сердца, инфаркт миокарда, кардиомиопатия, ишемическая болезнь сердца, аритмия, миокардит, перикардит, стенокардия, гипертоническая болезнь сердца, эндокардит, ревматическая болезнь сердца, врожденный порок сердца или атеросклероз, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества соединения, описанного в настоящем документе, такого как MRS4322 или MRS1873, или их фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения описанное в настоящем документе соединение обеспечивает модуляцию чувствительных к АТФ калиевых каналов, например, при помощи агонизма смещенной активности, частичного агонизма или частичного агонизма смещенной активности на рецепторе  $A_3R$ .

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное заболевание сердца или сердечно-сосудистое заболевание представляет собой ишемию сердца или инфаркт миокарда.

Другие заболевания.

При помощи соединений, которые модулируют полезные эффекты, такие как нейропротекция, например, посредством увеличения митохондриальной активности астроцитов, также можно лечить множество других заболеваний. Например, благодаря роли астроцитов в нейропротекции, описанной в настоящем документе, активация астроцитов, например, посредством модуляции рецептора  $A_3R$  и/или  $P_2Y_1$ , может быть полезна для лечения различных заболеваний и состояний, описанных в настоящем документе ниже. Соответственно, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения относится к

способу лечения или стимуляции нейропротекции или нейрорепарации у пациента, страдающего от заболевания или состояния, включающему введение указанному пациенту эффективного количества соединения, описанного в настоящем документе, например MRS4322 или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное заболевание или состояние выбрано из аутоиммунных заболеваний, аллергических заболеваний и/или отторжения трансплантата и заболевания "трансплантат против хозяина" (о применении конкретных нуклеозидных и нуклеотидных соединений для лечения этих состояний см., например, WO 2007/20018, полное содержание включено в данное описание посредством ссылки). В других вариантах реализации настоящего изобретения указанное заболевание или состояние выбрано из внутриглазной гипертензии и/или глаукомы (о применении конкретных нуклеозидных и нуклеотидных соединений для лечения этих состояний см., например, WO 2011/77435, полное содержание включено в данное описание посредством ссылки). В других вариантах реализации настоящего изобретения указанное заболевание или состояние выбрано из чувствительности к запаху и/или обонятельного нарушения (о применении конкретных нуклеозидных и нуклеотидных соединений для лечения этих состояний см., например, EP1624753, полное содержание включено в данное описание посредством ссылки). В других вариантах реализации настоящего изобретения указанное заболевание или состояние выбрано из диабета 2 типа и/или снятия боли (о применении конкретных нуклеозидных и нуклеотидных соединений для лечения этих состояний см., например, US 2010/0256086, полное содержание включено в данное описание посредством ссылки). В других вариантах реализации настоящего изобретения указанное заболевание или состояние выбрано из респираторных заболеваний и/или сердечно-сосудистых заболеваний (о применении конкретных нуклеозидных и нуклеотидных соединений для лечения этих состояний см., например, FASEB J. (2013) 27:1118.4 (тезисы совещания), полное содержание включено в данное описание посредством ссылки). В других вариантах реализации настоящего изобретения указанное заболевание или состояние выбрано из нарушений функций ЦНС, нарушений обучения и/или нарушения познавательной способности (о применении конкретных нуклеозидных и нуклеотидных соединений для лечения этих состояний см., например, *Neuropsychopharmacology*. 2015 Jan;40(2): 305-14. doi: 10.1038/npp.2014.173. Epub 2014 Jul 15. "Impaired cognition after stimulation of a P2Y<sub>1</sub> receptor in the rat medial prefrontal cortex," Koch, H. et al. PMID: 25027332, полное содержание включено в данное описание посредством ссылки). В других вариантах реализации настоящего изобретения указанное заболевание или состояние выбрано из нейродегенеративного заболевания, такого как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, прионная болезнь и/или боковой амиотрофической склероз (о применении конкретных нуклеозидных и нуклеотидных соединений для лечения этих состояний см., например, US 8691775, полное содержание включено в данное описание посредством ссылки). В других вариантах реализации настоящего изобретения указанное заболевание или состояние выбрано из расстройств слуха, болезни Меньера, эндолимфатической водянки, прогрессирующей потери слуха, головокружения, вертиго, шума в ушах, поврежденный головного мозга, связанных с лучевой терапией рака и/или лечением мигрени (о применении конкретных нуклеозидных и нуклеотидных соединений для лечения этих состояний см., например, US 2009/0306225; UY31779 и US 8399018, полное содержание каждого из которых включено в данное описание посредством ссылки). В других вариантах реализации настоящего изобретения указанное заболевание или состояние выбрано из патологических нарушений сна, депрессии, нарушений сна у пожилых людей, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, эпилепсии, шизофрении и/или симптомов, испытываемых выздоравливающими алкоголиками (о применении конкретных нуклеозидных и нуклеотидных соединений для лечения этих состояний см., например, US 2014/0241990, полное содержание включено в данное описание посредством ссылки). В других вариантах реализации настоящего изобретения указанное заболевание или состояние выбрано повреждения нейронов или нервов периферической нервной системы во время операции (о применении конкретных нуклеозидных и нуклеотидных соединений для лечения этих состояний см., например, US 8685372, полное содержание включено в данное описание посредством ссылки). В других вариантах реализации настоящего изобретения указанное заболевание или состояние представляет собой рак, такой как рак простаты (о применении конкретных нуклеозидных и нуклеотидных соединений для лечения этих состояний см., например, *Biochem Pharmacol*. 2011 August 15; 82(4): 418-425. doi:10.1016/j.bcp.2011.05.013. "Activation of the P2Y<sub>1</sub> Receptor Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation of Prostate Cancer Cells," Qiang Wei et al., полное содержание включено в данное описание посредством ссылки). В других вариантах реализации настоящего изобретения указанное заболевание или состояние выбрано из одного или нескольких желудочно-кишечных состояний, таких как запор и/или диарея (о применении конкретных нуклеозидных и нуклеотидных соединений для лечения этих состояний см., например, *Acta Physiol (Oxf)*. 2014 Dec;212(4):293-305. doi:10.1111/apha.12408. "Differential functional role of purinergic and nitergic inhibitory cotransmitters in human colonic relaxation," Mane N1, Gil V, Martinez-Cutillas M, Clave P, Gallego D, Jimenez M.; и *Neurogastroenterol. Motil*. 2014 Jan;26(1): 115-23. doi: 10.1111/nmo.12240. Epub 2013 Oct 8. "Calcium responses in subserosal interstitial cells of the guinea-pig proximal colon," Tamada H., Hashitani H. PMID: 24329947, полное содержание включено в данное описание посредством ссылки). В других вариантах реализации настоящего изобретения указанное заболевание или состояние выбрано из боли, опосредованной ЦНС, такой как невропатическая боль, воспалительная

боль и/или острая боль (о применении конкретных нуклеозидных и нуклеотидных соединений для лечения этих состояний см., например, *Br J Pharmacol.* 2010 Mar;159(5): 1106-17. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00596.x. Epub 2010 Feb 5. "A comparative analysis of the activity of ligands acting at P2X and P2Y receptor subtypes in models of neuropathic, acute and inflammatory pain." Ando RD1, Mehesz B, Gyires K, Illes P, Sperlagh B. PMID: 20136836), полное содержание включено в данное описание посредством ссылки).

В других вариантах реализации настоящего изобретения указанное заболевание или состояние выбрано из рака головного мозга, такого как глиобластома (о применении конкретных нуклеозидных и нуклеотидных соединений для лечения этих состояний см., например, *Purinergic Signal.* 2015 Sep;11(3): 331-46. doi: 10.1007/s11302-015-9454-7. Epub 2015 May 15. "Potentiation of temozolomide antitumor effect by purine receptor ligands able to restrain the in vitro growth of human glioblastoma stem cells." D'Alimonte, I. et al. PMID: 25976165, полное содержание включено в данное описание посредством ссылки). В других вариантах реализации настоящего изобретения указанное заболевание или состояние представляет собой боль (о применении конкретных нуклеозидных и нуклеотидных соединений для лечения этих состояний см., например, *Biochem Pharmacol. Pharmacol Biochem Behav.* 2015 Jan; 128: 23-32. doi: 10.1016/j.pbb.2014.11.001. Epub 2014 Nov 6. "Participation of peripheral P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>6</sub> and P2Y<sub>11</sub> receptors in formalin-induced inflammatory pain in rats." Barragan-Iglesias P. et al. PMID: 25449358; и *Neuropharmacology.* 2014 Apr;79: 368-79. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.12.005. Epub 2013 Dec 12. "Blockade of peripheral P2Y<sub>1</sub> receptors prevents the induction of thermal hyperalgesia via modulation of TRPV1 expression in carrageenan-induced inflammatory pain rats: involvement of p38 MAPK phosphorylation in DRGs." Kwon SG, Roh DH, Yoon SY, Moon JY, Choi SR, Choi HS, Kang SY, Han HJ, Beitz AJ, Lee JH. PMID: 24333674, полное содержание включено в данное описание посредством ссылки). В других вариантах реализации настоящего изобретения указанное заболевание или состояние выбрано из желудочно-кишечных расстройств, таких как диарея (о применении конкретных нуклеозидных и нуклеотидных соединений для лечения этих состояний см., например, *Acta Physiol (Oxf).* 2014 Dec;212(4): 293-305. doi: 10.1111/apha.12408. "Differential functional role of purinergic and nitrergic inhibitory cotransmitters in human colonic relaxation," Mane N., Gil V, Martinez-Cutillas M, Clave P, Gallego D, Jimenez M., полное содержание включено в данное описание посредством ссылки). В других вариантах реализации настоящего изобретения указанное заболевание или состояние выбрано из ухудшения когнитивной деятельности (о применении конкретных нуклеозидных и нуклеотидных соединений для лечения этих состояний см., например, *Neuropsychopharmacology.* 2015 Jan; 40(2): 305-14. doi: 10.1038/npp.2014.173. Epub 2014 Jul 15. "Impaired cognition after stimulation of P2Y<sub>1</sub> receptors in the rat medial prefrontal cortex," Koch H, Beshpalov A, Drescher K, Franke H, Krügel U. PMID: 25027332, полное содержание включено в данное описание посредством ссылки).

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, связанного с повреждением головного мозга или нейродегенеративным состоянием, такого как эпилепсия, мигрень, повреждение головного мозга, связанное с лучевой терапией рака, депрессия, изменения настроения или поведения, деменция, неустойчивость поведения, суицидальность, тремор, хorea Хантингтона, потеря координации движений, глухота, нарушение речи, сухость глаз, гипомимия, дефицит внимания, потеря памяти, затрудненность мыслительного процесса, вертиго, дизартрия, дисфагия, нарушения зрения или дезориентация, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества соединения, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист A<sub>3</sub>R. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист P2Y<sub>1</sub>. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора A<sub>3</sub>. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист рецептора P2Y<sub>1</sub>. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой MRS4322 или MRS1873 или их фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительных вариантах реализации настоящее изобретение относится к способу лечения нейродегенеративного заболевания, выбранного из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, рассеянного склероза, бокового амиотрофического склероза и прионной болезни у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение эффективного количества соединения, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист A<sub>3</sub>R. В одном варианте реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист P2Y<sub>1</sub>. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист на рецепторе A<sub>3</sub>. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности или антагонист на рецепторе P2Y<sub>1</sub>. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой MRS4322 или MRS1873 или их фармацевтически приемлемую соль.

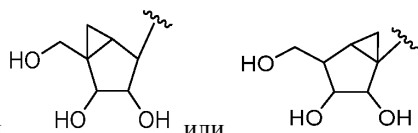
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное улучшение когнитивной или неврологической функции измеряется как увеличение оценки на от примерно 1% до 20% в тесте на отсроченное припоминание по пересмотренной шкале памяти Векслера. Например, указанное улучшение когнитивной функции может быть измерено как увеличение оценки на от примерно 1% до 20% или от примерно 1% до 5%.

2. Описание некоторых соединений согласно настоящему изобретению.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к соединениям, пригодным для лечения, облегчения или ускорения восстановления от конкретных состояний головного мозга или центральной нервной системы (ЦНС), таких как повреждение мозга или нейродегенеративное состояние. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение усиливает нейропротекцию и нейрорепарацию, опосредованные астроцитами, и таким образом лечит, облегчает или способствует восстановлению после указанного состояния. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение является селективным в отношении рецептора  $A_3$ , например, селективным в отношении рецептора  $A_3$  по меньшей мере в 10 раз по сравнению с другими аденозиновыми рецепторами; или, например, более чем в 25, 50, 100, 500 или 1000 раз по сравнению с другими аденозиновыми рецепторами. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение селективно модулирует рецептор  $A_3$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой селективный агонист на рецепторе  $A_3$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой селективный частичный агонист на рецепторе  $A_3$ . В некоторых варианте реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой полный или частичный агонист смещенной активности. В некоторых варианте реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой полный или частичный антагонист смещенной активности.

В дополнительных вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение является селективным в отношении рецепторов  $P2Y_1$ , например, селективным в отношении рецепторов  $P2Y_1$  по меньшей мере в 10 раз по сравнению с другими  $P2Y$  рецепторами; или, например, более чем в 25, 50, 100, 500 или 1000 раз по сравнению с другими  $P2Y$  рецепторами. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение селективно модулирует рецептор  $P2Y_1$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой селективный агонист на рецепторе  $P2Y_1$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой селективный частичный агонист на рецепторе  $P2Y_1$ . В некоторых варианте реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой полный или частичный агонист смещенной активности. В некоторых варианте реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой полный или частичный антагонист смещенной активности. Термин "со смещенной активностью" относится к соединениям, которые преимущественно модулируют, активируют, агонизируют или антагонизируют один или более путей, связанный с рецептором, но не все пути.

Без связи с какой-либо теорией полагают, что полный или частичный агонизм или антагонизм смещенной активности позволяет селективно модулировать один или более путей, связанных с рецептором  $A_3$  или  $P2Y_1$ , что может привести к улучшенному лечению заболевания или состояния и предотвращению модуляции нежелательных путей (что может привести к побочным эффектам). Селективная модуляция может предпочтительно активировать астроциты, как описано в настоящем документе, например, для лечения повреждения головного мозга или нейродегенеративного заболевания или состояния. Соответственно, в некоторых вариантах реализации соединения по настоящему соединению представляет собой полный или частичный агонист или антагонист смещенной активности одного или нескольких G-сопряженных или G-независимых путей, связанных с аденозиновым рецептором  $A_3$  или рецептором  $P2Y_1$ . В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение селективно модулирует путь, опосредованный рецептором  $A_3$  или  $P2Y_1$ , такой как активация бета-аррестина, внутриклеточная мобилизация кальция, модуляция цАМФ, активация АТФ-зависимого калиевого канала или фосфорилирование ERK1/2, или другие последующие клеточные активности, связанные с такими путями. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанный путь увеличивает нейропротекцию, нейрорепарацию, кардиопротекцию или кардиовосстановление, или связан с ними. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение выбрано из (N)-метанокарбануклеозида, такого как MRS4322; или его фармацевтически приемлемой соли. Используемый в настоящем документе термин "метанокарбануклеозид" относится к аналогу нуклеозида, в котором кислород, присутствующий в тетрагидрофурановом кольце рибозного сахара, заменен метиленовым звеном, а полученное карбоциклическое кольцо конденсировано с циклопропильным кольцом с образова-

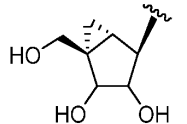


нием бицикло[3.1.0]гексана, например, как структуры

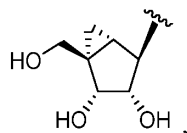
Без связи с какой-либо теорией полагают, что метанокарбануклеозиды имитируют сахарную кон-



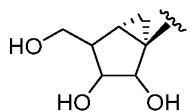
формацию или псевдоконформацию, которая, как полагают, предпочтительна для конкретных подтипов рецепторов. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения "северные" метанокарбануклеозиды представляют собой такие, которые имитируют или предпочитают C3'-эндо/C2'-экзо-конформацию сахара, а "южные" метанокарбануклеозиды представляют собой такие, которые имитируют или предпочитают C3'-экзо/C2'-эндо-конформацию. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения (N)-метанокарбасахар ("северный" метанокарбасахар) имеет следующую структуру:



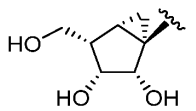
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения (N)-метанокарбасахар имеет следующую структуру:



которую в настоящем документе называют "D-(N)-метанокарбасахар". В других вариантах реализации настоящего изобретения метанокарбасахар находится в "южной", или (S)-метанокарба-конфигурации. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения такие метанокарбасахара представлены структурой:



В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения (S)-метанокарбасахар имеет следующую структуру:



которую в настоящем документе называют "D-(S)-метанокарбасахар".

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение является функционально селективным в отношении рецептора  $A_3$  или  $P2Y_1$ , то есть избирательно различает пути, опосредованные рецептором  $A_3$  или  $P2Y_1$ , например, за счет модуляции одного или более путей без оказания влияния на другие пути, или за счет активации одного или более путей и деактивации одного или более других путей. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение является антагонистом при измерении по передаче сигналов цАМФ, но частичным агонистом для рекрутирования  $\beta$ -аррестина. В других вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист Gq/11-опосредованной мобилизации  $Ca^{2+}$  и частичный агонист или антагонист рекрутирования аррестина. В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к способу лечения травмы головного мозга или нейродегенеративного заболевания или состояния посредством модуляции смещенной активности или функционально селективной модуляции рецептора  $A_3$  (например, за счет селективного агонизма или антагонизма путей, таких как упомянутые выше), включающему введение эффективного количества соединения, описанного в настоящем документе, нуждающемуся в этом пациенту. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение выбрано из DMPA, CCPA, MRS1760 или MRS542 (см. Verzijl D, et al., "Functional selectivity of adenosine receptor ligands," *Purinergic Signaling* 7: 171-192 (2011)). В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой DBXRM. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение выбрано из (N)-метанокарбануклеозида, такого как MRS4322; или его фармацевтически приемлемой соли.

Неожиданно было обнаружено, что некоторые пуриновые нуклеозидные моно-, ди- и трифосфаты, такие как подробно описанные в настоящем документе, быстро дефосфорилируются *in vivo*, возможно, при помощи эктонуклеотидаз, ферментов, ответственных за дефосфорилирование нуклеотидов, которые присутствуют на поверхности клеточных мембран и циркулируют в крови и плазме (см. Ziganshin et al. *Pflugers Arch.* (1995) 429: 412-418). Часто очень трудно предсказать, какие нуклеотидные аналоги будут субстратами для эктонуклеотидаз и, следовательно, ожидается, что они будут дефосфорилированы *in vivo*. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения дефосфорилированное соединение отвечает за терапевтическую эффективность. Таким образом, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения соответствующий фосфорилированный моно-, ди- или трифосфат или сложный фосфатный эфир, такой как сложный алкиловый или фениловый эфир, является пролекарством или предшественником агента, ответственного за терапевтический эффект.

В некоторых вариантах реализации соединения по настоящему изобретению способны проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). При использовании в настоящем документе термин "гематоэнцефалический барьер" или "ГЭБ" относится как к самому ГЭБ, так и к барьеру между кровью и спинным мозгом. Гематоэнцефалический барьер, состоящий из эндотелия сосудов головного мозга, базальной мембраны и нейроглиальных клеток, служит для ограничения проникновения веществ в мозг. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения отношение в мозгу/в плазме общего лекарственного средства составляет по меньшей мере примерно 0,01 после введения пациенту (например, перорального или внутривенного введения). В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения отношение в мозгу/в плазме общего лекарственного средства составляет по меньшей мере примерно 0,03. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения отношение в мозгу/в плазме общего лекарственного средства составляет по меньшей мере примерно 0,06. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения отношение в мозгу/в плазме общего лекарственного средства составляет по меньшей мере примерно 0,1. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения отношение в мозгу/в плазме общего лекарственного средства составляет по меньшей мере примерно 0,2.

Прототипические агонисты аденозинового А<sub>3</sub> рецептора, такие как CI-IB-МЕСА и MRS5698, представляют собой липофильные соединения с низкой растворимостью со значениями cLogP обычно >2. Эта липофильность является основным фактором, способствующим высокой степени связывания указанных соединений белками плазмы, высокой степени связывания мозгом и, как следствие, низкой свободной фракции лекарственного средства, доступного для взаимодействия с рецептором А<sub>3</sub> в мозге. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, например, в случае неврологических и нейродегенеративных состояний, физико-химические свойства соединений по настоящему изобретению, таких как MRS4322 и MRS1873, существенно различаются; эти и родственные им соединения представляют собой гидрофильные соединения с cLogP <0, обладающие высокой растворимостью, низкой степенью связывания плазмой и мозгом и высокой концентрацией несвязанного лекарственного средства, доступного для взаимодействия с рецептором А<sub>3</sub>.

Соответственно, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение имеет cLogP менее чем примерно 0,8, примерно 0,7, примерно 0,6, примерно 0,5, примерно 0,4, примерно 0,3, примерно 0,2, примерно 0,1, примерно 0,05, примерно 0,01 или примерно 0,005. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение имеет cLogP менее чем примерно 0, например, менее чем примерно -0,1, -0,2, -0,3, -0,4, -0,5, -0,6, -0,7, -0,8 или -0,9 или ниже. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения несвязанная фракция в плазме указанного соединения составляет примерно от 0,5 до 0,9. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения несвязанная фракция в плазме указанного соединения составляет примерно от примерно 0,6 до 0,85, от 0,7 до 0,8, или примерно 0,75. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения несвязанная фракция в плазме указанного соединения составляет по меньшей мере примерно 0,02, или по меньшей мере примерно 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,12, 0,15 или 0,17 или выше. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения несвязанная фракция в плазме указанного соединения составляет примерно от 0,6 до 0,85, от 0,7 до 0,8, или примерно 0,75 и/или примерно 0,08. Соединения согласно настоящему изобретению можно получать при помощи способов, известных в данной области техники, в рамках обычных экспериментов. Например, некоторые соединения согласно настоящему изобретению можно получить в соответствии с процедурами, описанными в патенте США № 7087589 (и в процитированных там документах), содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение выбрано из: аденозина, АДФ, тринатриевой соли 2-метилтио-АДФ, АТФ, динатриевой соли АТФ, α,β-метилена-АТФ, α,β-метиленаденозин 5'-трифосфат тринатриевой соли, 2-метилтиоаденозин трифосфат тетранатриевой соли, 2-MeSATP, триэтиламмониевой соли BzATP, инозина, цитидина, ацилированных цитидинов, цитидина монофосфата (CMP), цитидина дифосфата (CDP), цитидина трифосфата (CTP), CDP-холина, CMP-холина, денуфосола тетранатрия, GTP, ИТФ, MRS 541, MRS 542, MRS 1760, MRS 2179, MRS 2279, MRS 2341, MRS 2365, MRS 2500, MRS 2690, MRS 2698, MRS 3558, MRS 4322, MRS 5151, MRS 5676, MRS 5678, MRS 5697, MRS 5698, MRS 5923, MRS 5930, бензил-NECA, IB-МЕСА, CI-IB-МЕСА, LJ529, DPMA, CCPA, DBXRM, HEMADO, PEMADO, HENECA, PENECA, CP608,039, CP532,903, CGS21680, AR132, VT72, VT158, VT160, VT163, PSB 0474, уридин-5'-дифосфата (УДФ), УДФ-глюкозы, уридин-β-тиодифосфата (УДФβS), уридин-5'-трифосфата (УТФ), уридин-γ-тиофосфата (УТФγS), тетранатриевой соли 2-тиоУТФ, тринатриевой соли УТФγS, уридин- 5'-дифосфоглюкозы, диуридин-трифосфата, 2-(гексилтио)(НТ)-АМФ, диаденозина пентафосфата, 2'-дезоксид-2'-амино-УТФ, 2-тио-УТФ, триацетилуридина, диацетил/ацил-уридина, уридина, сурамина, аналогов дипиридамола, диаденозинтетрафосфата, Ар<sub>4</sub>U, Ар<sub>4</sub>A, INS365, INS37217 или INS48823; при этом каждый сахар может быть заменен метанокарбосахаром в "северной" или "южной" конформации или каждый сахар может быть заменен D-рибосахаром; или его фармацевтически приемлемой соли.

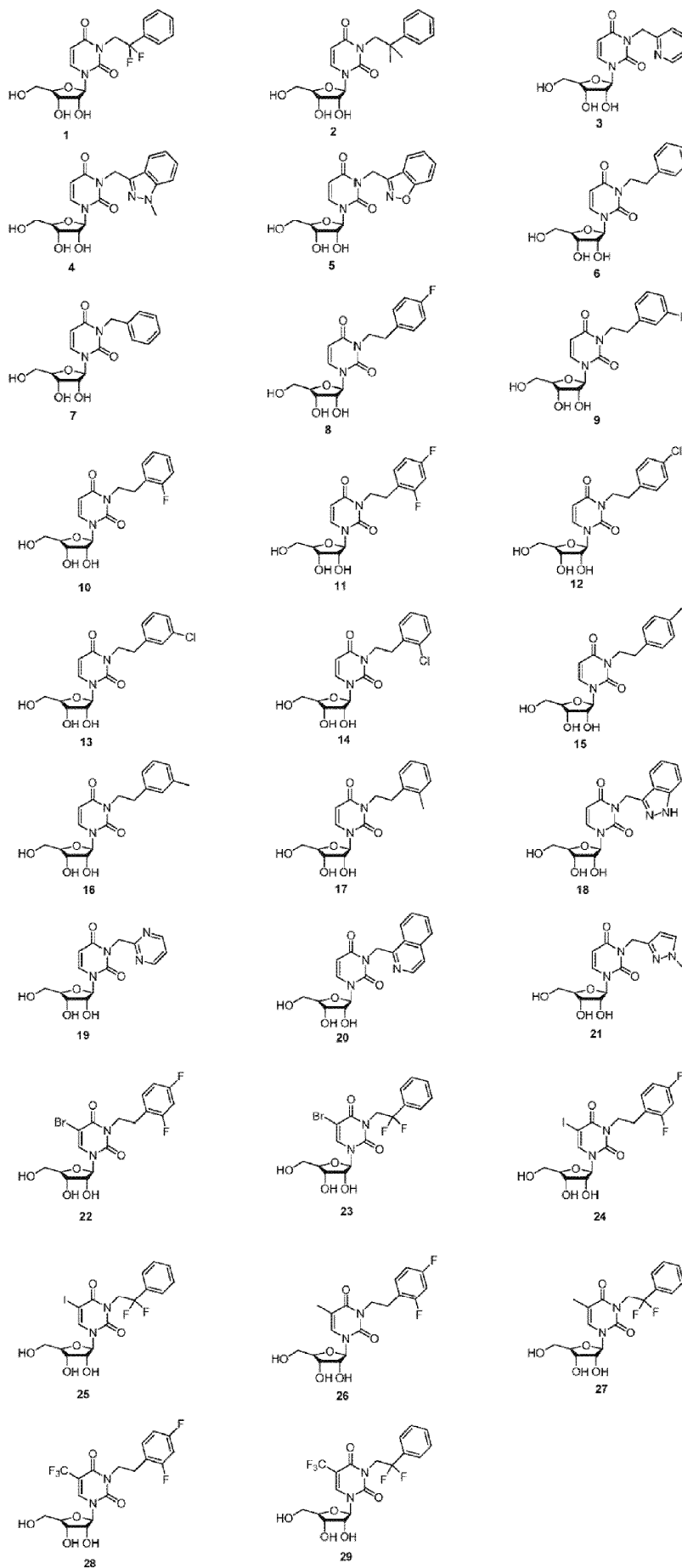
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения 2-метилтио-АДФ или его фармацевтически приемлемая соль пригодны для способов согласно настоящему изобретению. Не желая быть свя-

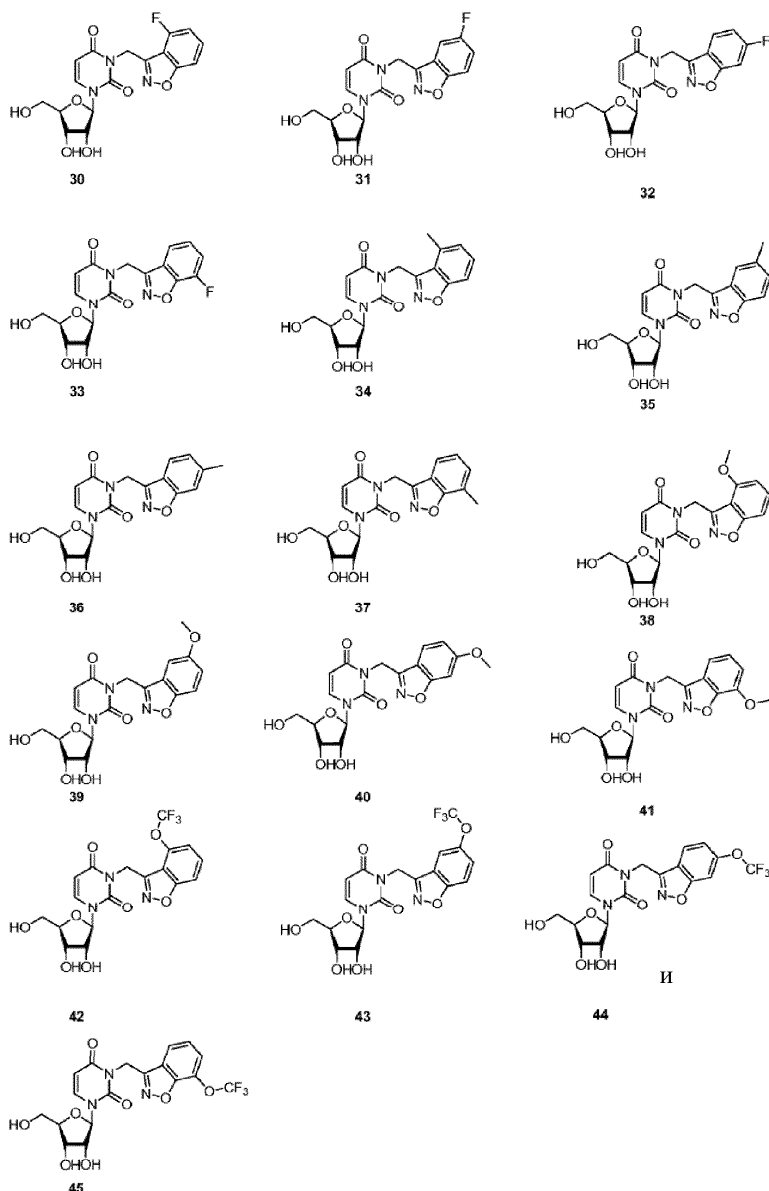
занными с какой-либо теорией, полагают, что 2-MeS АДФ *in vivo* быстро гидролизуеться до 2-метилтиоаденозина, где он является агонистом смещенной активности, частичным агонистом или частичным агонистом смещенной активности A<sub>3</sub>R. Полагают, что 2-метилтиоаденозин имеет данные рецептора, очень похожие на данные MRS4322.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист A<sub>3</sub>R, такой как N<sup>6</sup>-бензиладенозин-5'-N-метилурунамиды, такие как N<sup>6</sup>-(3-йодбензил)-аденозин-5'-N-метилурунамид, также известный как IB-МЕСА или Can-Fite CF-101, или 2-хлоро-N<sup>6</sup>-(3-йодбензил)-аденозин-5'-N-метилурунамид (также известный как 2-CI-IB-МЕСА или Can-Fite CF-102); (N)-метанокарбануклеозиды, такие как (1R,2R,3S,4R)-4-(2-хлоро-6-((3-хлоробензил)амино)-9H-пурин-9-ил)-2,3-дигидрокси-N-метилбицикло[3.1.0]гексан-1-карбоксамид (также известный как CF502, Can-Fite Biopharma, MA); метиленамид (2S,3S,4R,5R)-3-амино-5-[6-(2,5-дихлоробензиламино)пурин-9-ил]-4-гидрокси-тетрагидрофуран-2-карбоновой кислоты (также известный как CP532,903); (1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4-(2-хлоро-6-(3-хлоробензиламино)-9H-пурин-9-ил)-2,3-дигидрокси-N-метилбицикло[3.1.0]гексан-1-карбоксамид (также известный как MRS3558), 2-(1-гексинил)-N-метиладенозин; (1S,2R,3S,4R)-2,3-дигидрокси-4-(6-((3-йодбензил)амино)-4H-пурин-9(5H)-ил)-N-метициклопентанкарбоксамид (также известный как CF101, Can-Fite); (1S,2R,3S,4R)-4-(2-хлоро-6-((3-йодобензил)амино)-4H-пурин-9(5H)-ил)-2,3-дигидрокси-N-метициклопентанкарбоксамид (также известный как CF102, Can-Fite); (1'R,2'R,3'S,4'R,5'S)-4-{2-хлоро-6-[(3-йодофенилметил)амино]пурин-9-ил}-1-(метиламинокарбонил)-бицикло[3.1.0]гексан-2,3-диол (также известный как MRS1898); или 2-диалкинил-производные (N)-метанокарбануклеозидов; или их фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение выбрано из IB-МЕСА (также известного как CF101) или CI-IB-МЕСА (также известного как CF102); или их фармацевтически приемлемых солей. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение выбрано из (N)-метанокарбануклеозидов, такого как описанные выше; или его фармацевтически приемлемой соли.

Также включены аллостерические модуляторы A<sub>3</sub>R, которые усиливают активность рецептора в присутствии нативного лиганда, например, 2-циклогексил-N-(3,4-дихлорфенил)-1H-имидазо[4,5-c]хинолин-4-амин (также известный как CF602, Can-Fite). Однако перечисленные выше агонисты A<sub>3</sub>R ни в коем случае не являются единственными возможными для применения, можно применять и другие такие агонисты. Также предполагается введение агонистов A<sub>3</sub>R, ковалентно связанных с полимерами. Например, агонисты A<sub>3</sub>R можно вводить в форме конъюгатов, где агонист связан с полиамидоаминовым дендримером (РАМАМ).

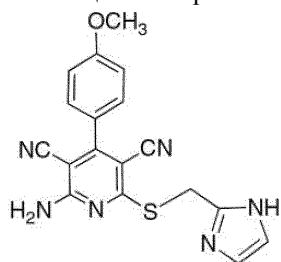
Без связи с какой-либо теорией полагают, что полный или частичный агонизм, включая антагонизм смещенной активности, некоторыми аналогами уридина позволит селективно модулировать один или более путей, что может привести к улучшенному лечению заболевания или состояния, описанного в настоящем документе, и предотвращению модуляции нежелательных путей (что может привести к побочным эффектам). В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения селективная модуляция предпочтительно активирует астроциты или другие глиальные клетки, такие как микроглия и олигодендроциты, для лечения повреждения мозга или нейродегенеративного заболевания или состояния, описанных в настоящем документе. Определенные соединения-аналоги уридина, пригодные для применения в настоящем изобретении, описаны WO 2014/160502, полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист A<sub>3</sub>R. В одном варианте реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист P2Y<sub>1</sub>. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности аденозинового рецептора, такого как рецептор A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> или A<sub>3</sub>. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности рецептора A<sub>3</sub>. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности, частичный агонист или частичный агонист смещенной активности рецептора P2Y<sub>1</sub>. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение выбрано из группы, состоящей из:



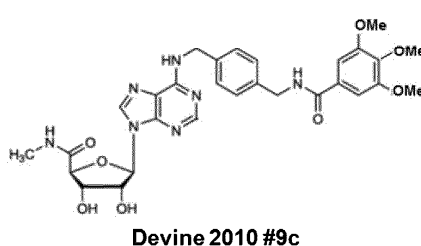
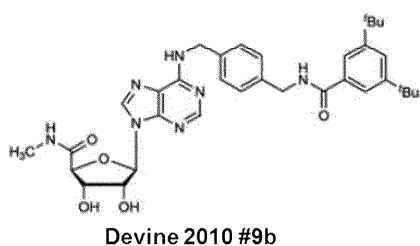
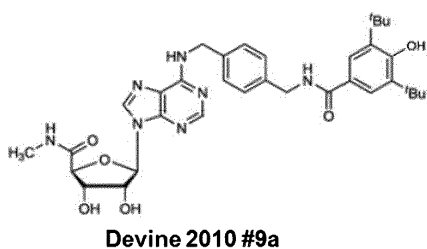
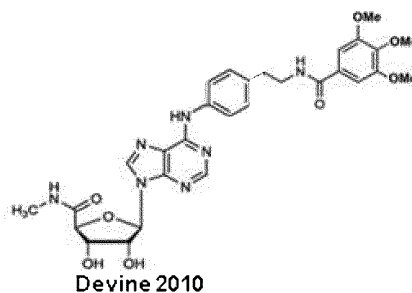
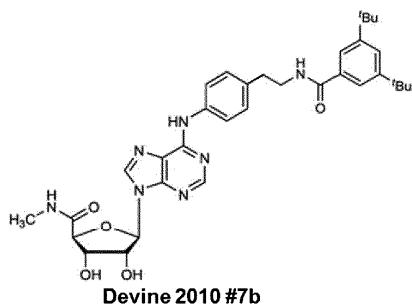


или его фосфорилированного аналога; или его фармацевтически приемлемой соли.

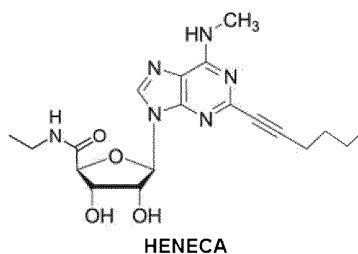
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение выбрано из:



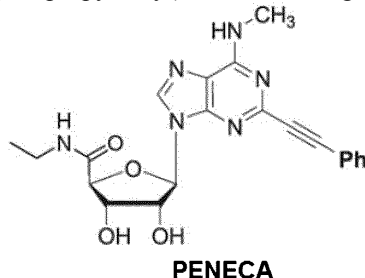
(см. Beukers MW et al., (2004) "New, non-adenosine, high-potency agonists for the human adenosine A2B receptor with an improved selectivity profile compared to the reference agonist N-ethylcarboxamidoadenosine," J. Med. Chem. 47(15):3707-3709);



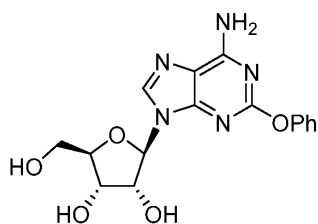
(см. Devine SM et al. "Synthesis and Evaluation of new A<sub>3</sub>R agonists," *Bioorg Med Chem* 18, 3078-3087. 2010; и Muller CE, Jacobson KA. "Recent Developments in adenosine receptor ligands and their potential for novel drugs," *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 1290-1308. 2011);



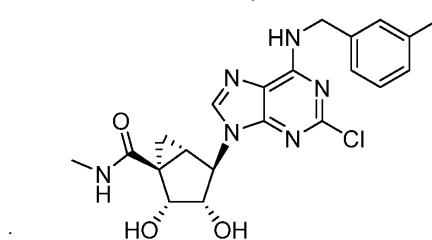
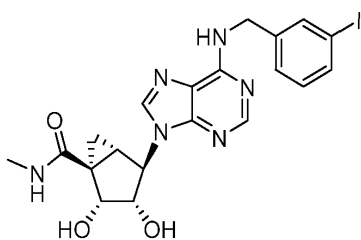
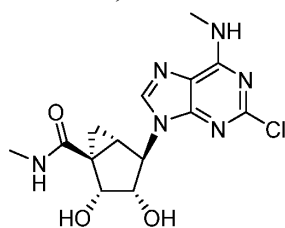
(см. Ben DD et al. "Different efficacy of adenosine and NECA derivatives at the human A<sub>3</sub> receptor: Insight into the receptor activation switch," *Biochem Pharm* 87, 321-331. 2014; и Camaioni E, Di Francesco E, Vittori S, Volpini R, Cristalli G. "Adenosine receptor agonists: synthesis and biological evaluation of the diastereoisomers of 2-(3-hydroxy-3-phenyl-1-propyn-1-yl)NECA," *Bioorg Med Chem* 1997; 5: 2267-75);



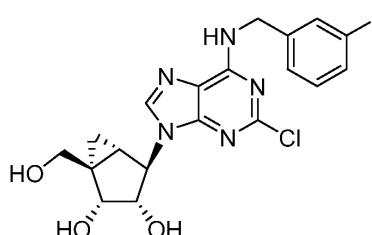
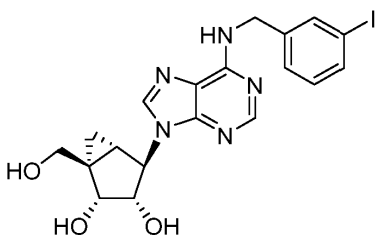
(см. Klotz, K.N. "2-Substituted N-ethylcarboxamidoadenosine derivatives as high-affinity agonists at human A<sub>3</sub> adenosine receptors," *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999 Aug;360(2):103-8; и Cristalli G et al. (1995) "2-Aralkynyl and 2-heteroalkynyl derivatives of adenosine-5'-N-ethyluronamide as selective A<sub>2a</sub> adenosine receptor agonists," *J Med Chem* 38:1462-1472);



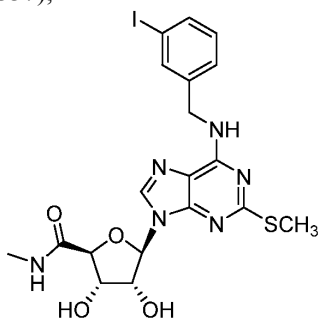
(cm. Kim S et al. "3D quantitative SAR at A3R," J Chem Inf. Model 47, 1225-1233 2007);



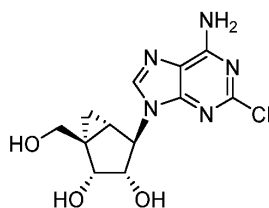
(MRS1898);



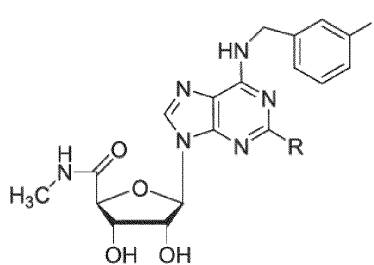
(cm. Lee, K. et al. "Ring-Constrained (N)-Methanocarba Nucleosides as Adenosine Receptor Agonists," Bioorg Med Chem Lett 2001, 11, 1333-1337);



(cm. Kenneth A. Jacobson et al. Chapter 6. A3 Adenosine Receptor Agonists: History and Future Perspectives pp. 96-97. Book - Springer: A3 Adenosine Receptors from Cell Biology to Pharmacology and Therapeutics, 2009);

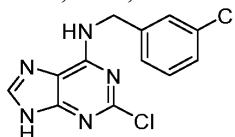


(cm. Lee K et al. "Ring-Constrained (N)-Methanocarba Nucleosides as Adenosine Receptor Agonists," Bioorg Med Chem Lett 2001, 11, 1333-1337; и Gao et al. "Structural Determinants of A3R Activation: Nucleoside Ligands at the Agonist/Antagonist Boundary," J. Med. Chem., 2002, 45, 4471-4484);

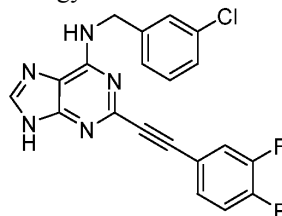


R = H: **IB-MECA (CF101)**  
R = Cl: **Cl-IB-MECA (CF102)**

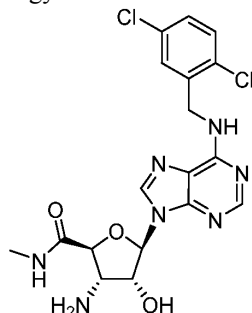
(см. Muller CE, Jacobson KA, "Recent Developments in adenosine receptor ligands and their potential for novel drugs," *Biochimica et Biophysica Acta* 2011, 1808, 1290-1308);



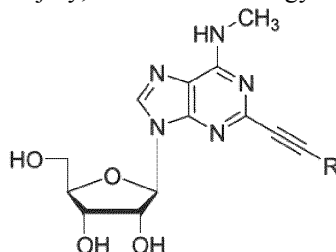
(MRS5930; см. Jacobson KA et al. "John Daly Lecture: Structure-guided Drug Design for Adenosine and P2Y Receptors," *Comp. and Struct. Biotechnology Jour* 13. 286-298. 2015);



(MRS5923; см. Jacobson KA et al. "John Daly Lecture: Structure-guided Drug Design for Adenosine and P2Y Receptors," *Corp. and Struct. Biotechnology Jour* 13. 286-298. 2015);



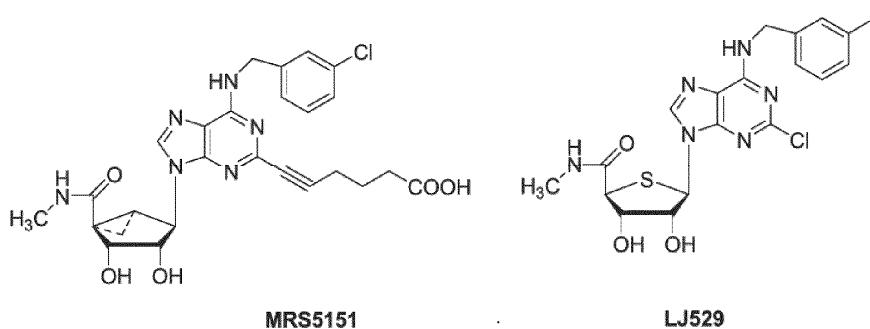
CP532,903 (см. Tracey WR et al. "Novel n6-substituted adenosine 5'-N-methyluronamides with high selectivity for human A3R reduce ischemic myocardial injury," *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285. 2003; Muller CE, Jacobson KA, "Recent Developments in adenosine receptor ligands and their potential for novel drugs," *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 1290-1308. 2011; и Wan TC et al. "The A3R Agonist CP-532,903 Protects against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury," *J. of Pharmacology and Exptl Therapies* 324,1. 2008);



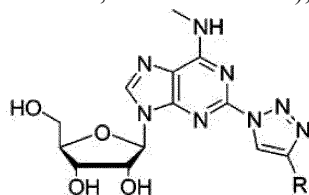
R =  $nC_4H_9$ : **HEMADO**  
R = Ph: **PEMADO**

(см. Volpini R et al. "HEMADO as Potent and Selective Agonists of hA3R," *J Med Chem* 45, 3271-3279. 2002; Muller CE et al. "Recent Developments in adenosine receptor ligands and their potential for novel drugs," *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 1290-1308. 2011; и Volpini R et al. "Synthesis and Evaluation of Potent and Highly Selective Agonists for hA3R," *J of Med Chem* 52, 7897-7900. 2009);

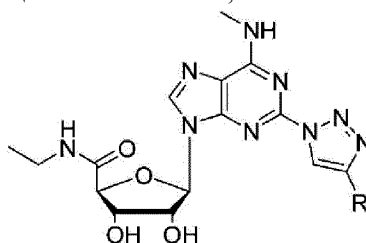




(см. Muller CE, Jacobson KA. "Recent Developments in adenosine receptor ligands and their potential for novel drugs," *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 1290-1308. 2011);

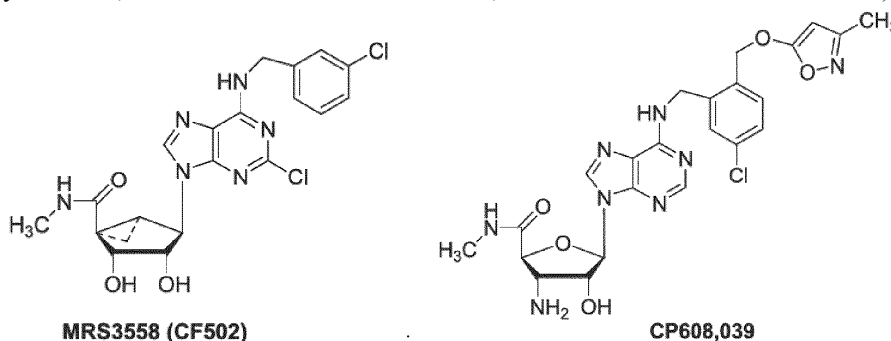


где R представляет собой H или циклопентилметил;

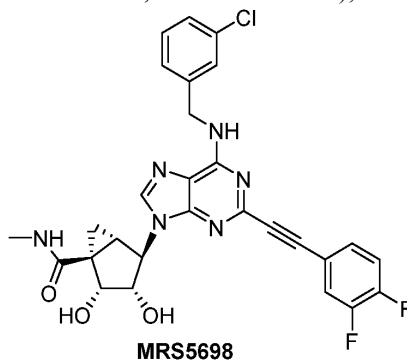


где R представляет собой H, бутил или пиридин-2-ил;

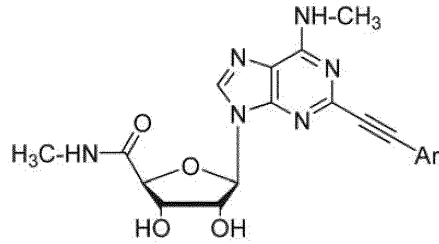
(см. Cosyn L. et al., "2-triazole-substituted adenosines," *J Med Chem* 2006. 49. 7373-7383);



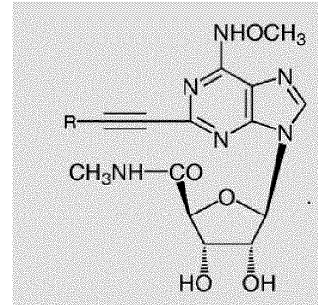
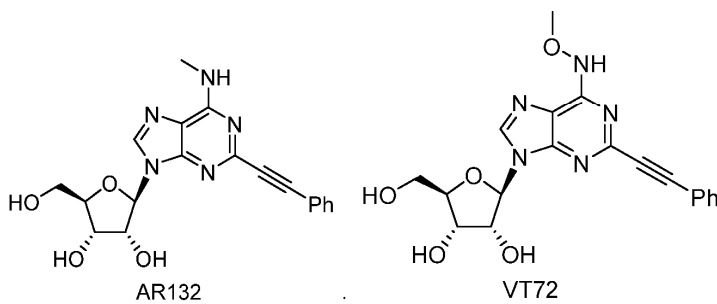
(см. Muller CE, Jacobson KA. "Recent Developments in adenosine receptor ligands and their potential for novel drugs," *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 1290-1308. 2011);



(см. Jacobson KA et al. "John Daly Lecture: Structure-guided Drug Design for Adenosine and P2Y Receptors," *Comp. and Struct. Biotechnology Jour* 13. 286-298. 2015);

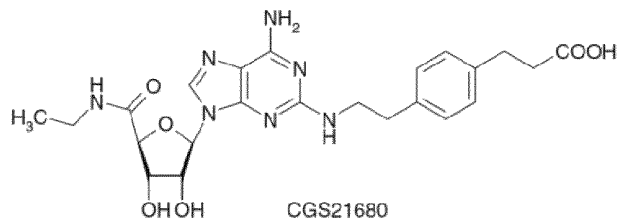


где Ar выбран из фенила, *p*-CH<sub>3</sub>CO-фенила, *p*-фторфенила или 2-пиридила (см. Volpini R et al. "Synthesis and Evaluation of Potent and Highly Selective Agonists for hA3R," J Med Chem 52, 7897-7900. 2009);

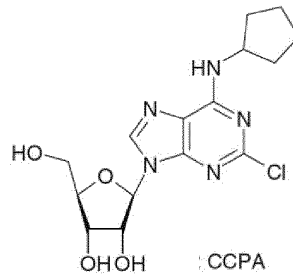


R=C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, VT158  
R= 2-пиридил, VT160  
R=*p*-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COCH<sub>3</sub>, VT163

(см. Pugliese AM et al, "Role of A3R on CA1 hippocampal neurotransmission during OGD," Biochem Pharmacology 74. 2007);

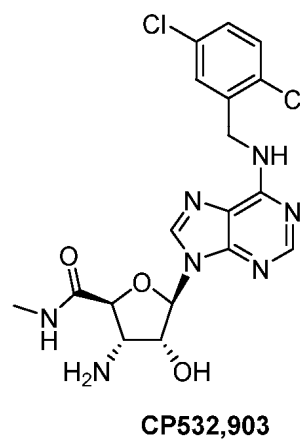
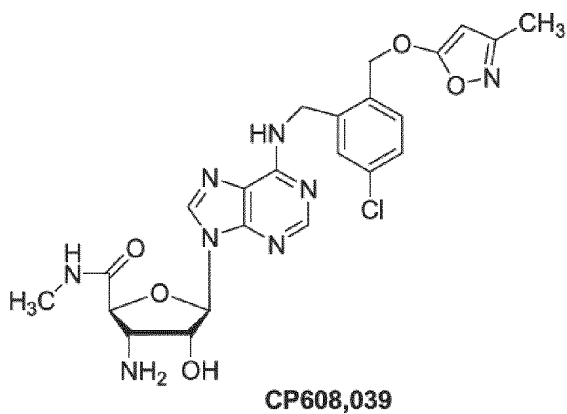
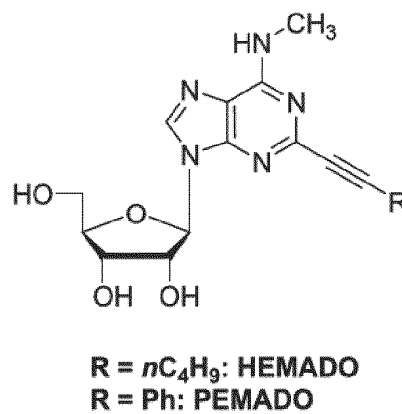
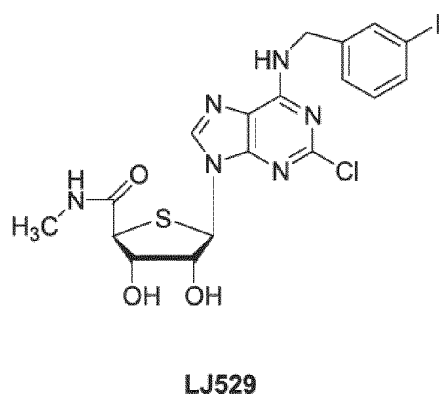
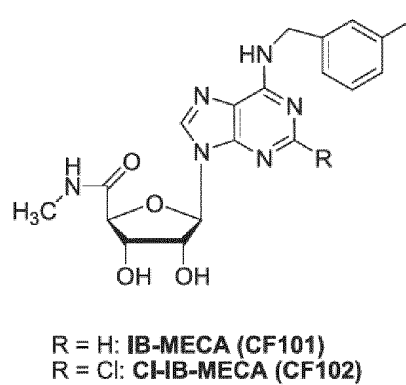
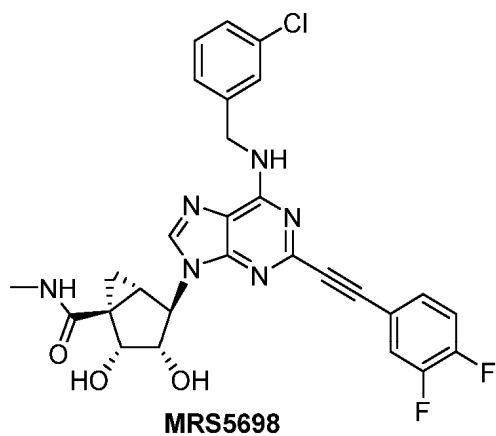


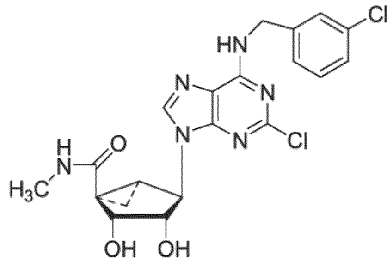
или



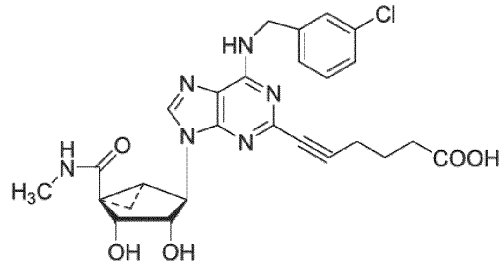
(см. Klotz KN "Adenosine receptors and their ligands NS's," Arch Pharmacol. 362. 382-391. 2000); или их фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение выбрано из (N)-метанокарбануклеозида, такого как описанные выше; или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение выбрано из:

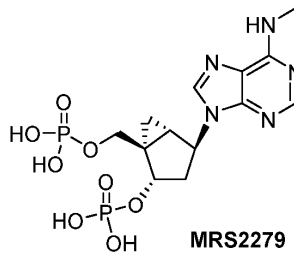




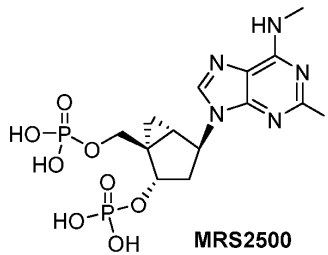
MRS3558 (CF502)



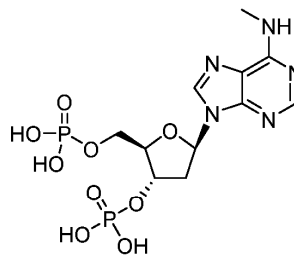
MRS5151



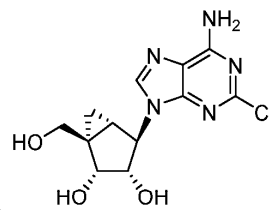
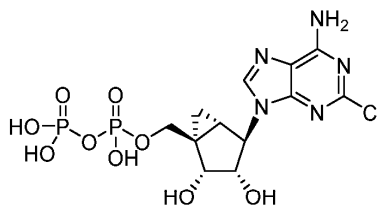
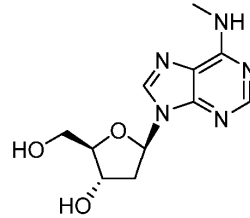
MRS2279



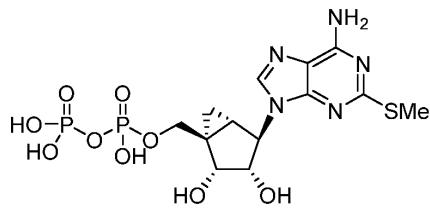
MRS2500



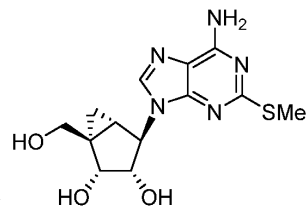
(MRS2179),



(MRS1873),

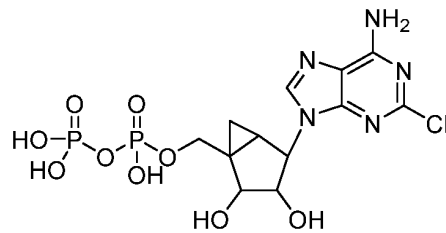


или

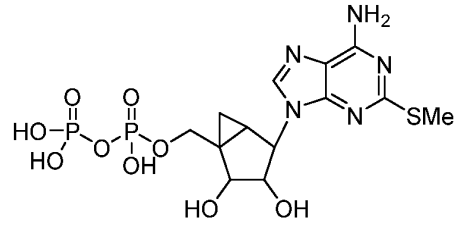


(MRS4322);

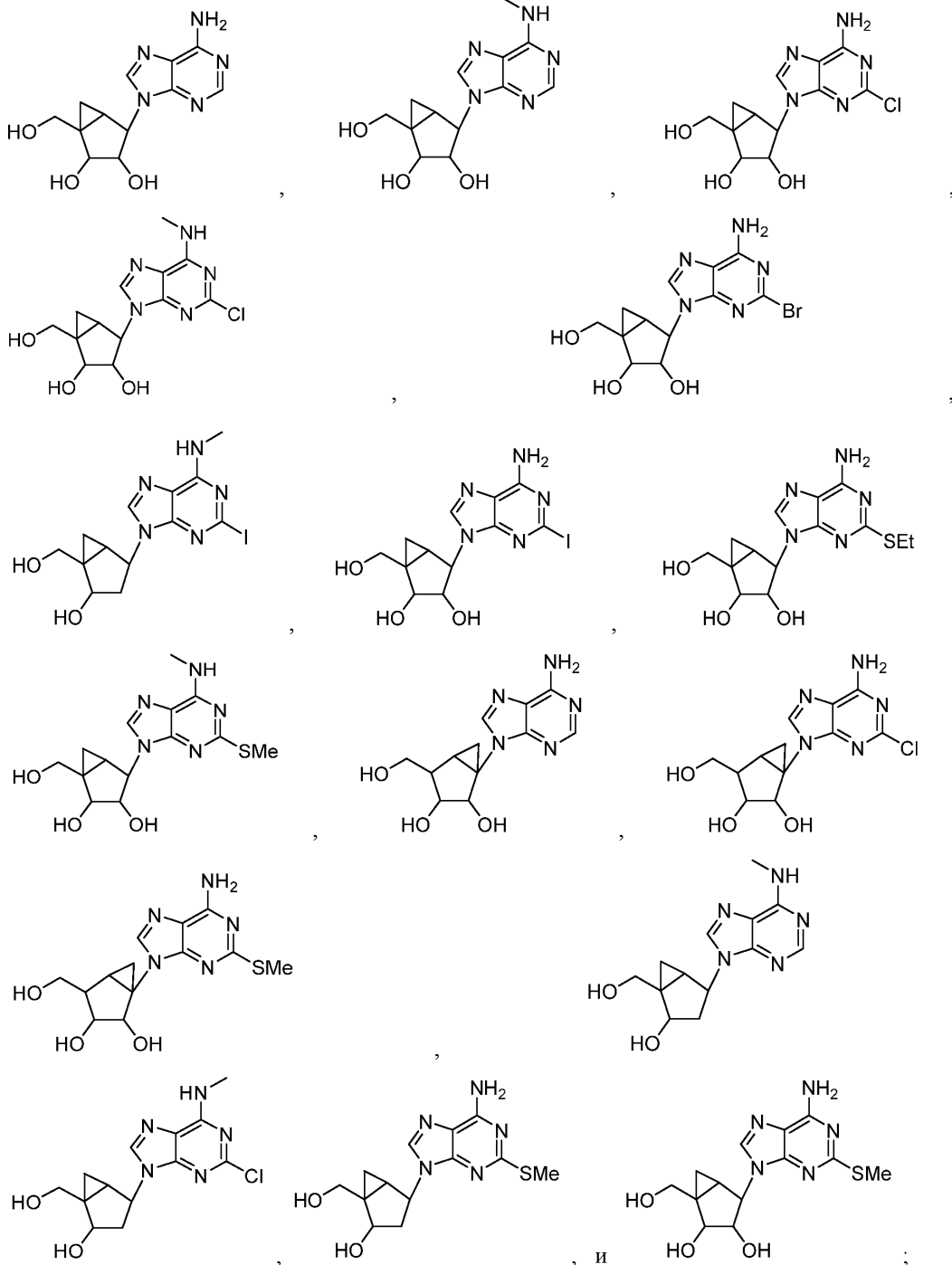
или их фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение выбрано из (N)-метанокарбануклеозида, такого как описанные выше; или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение выбрано из:



или

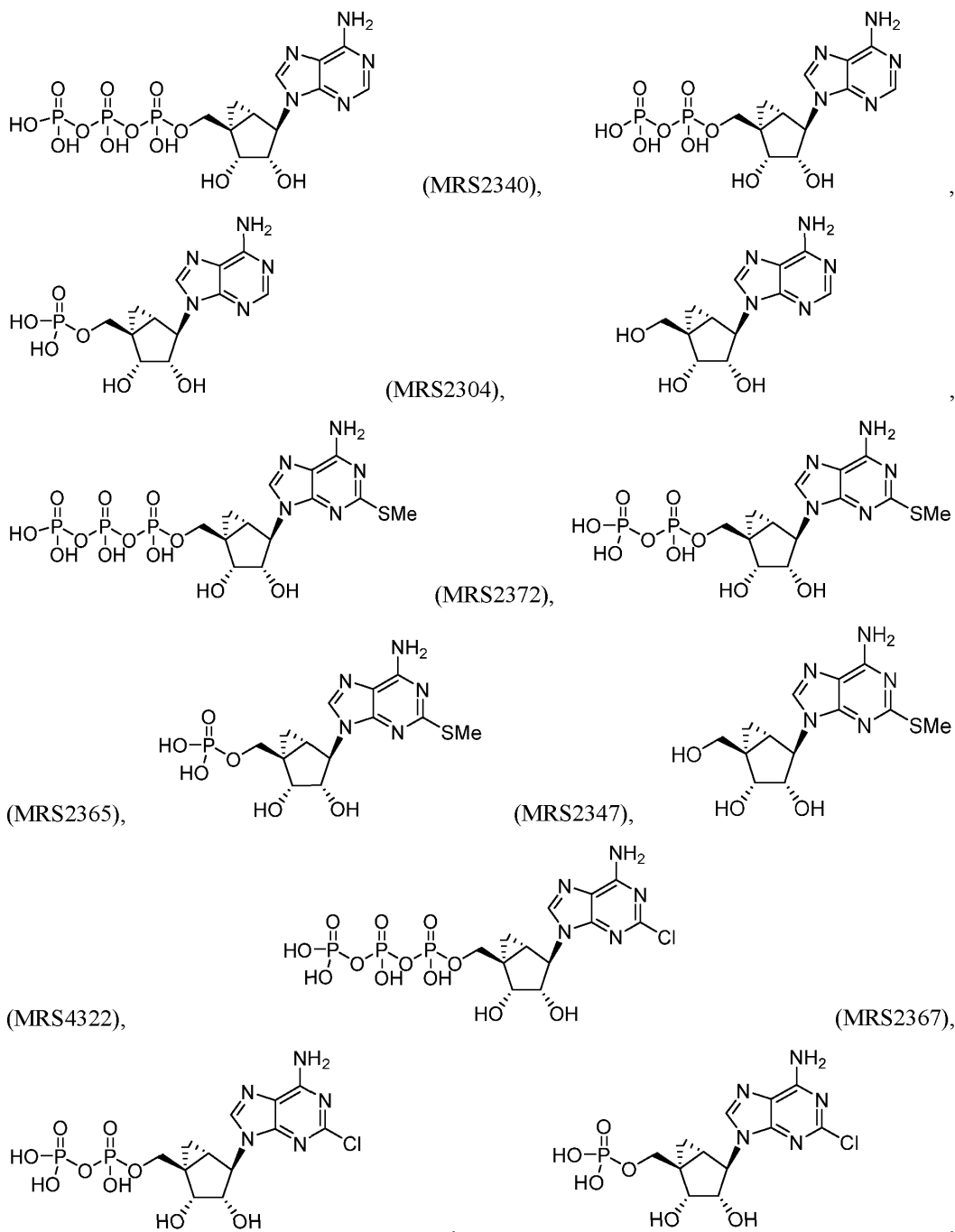


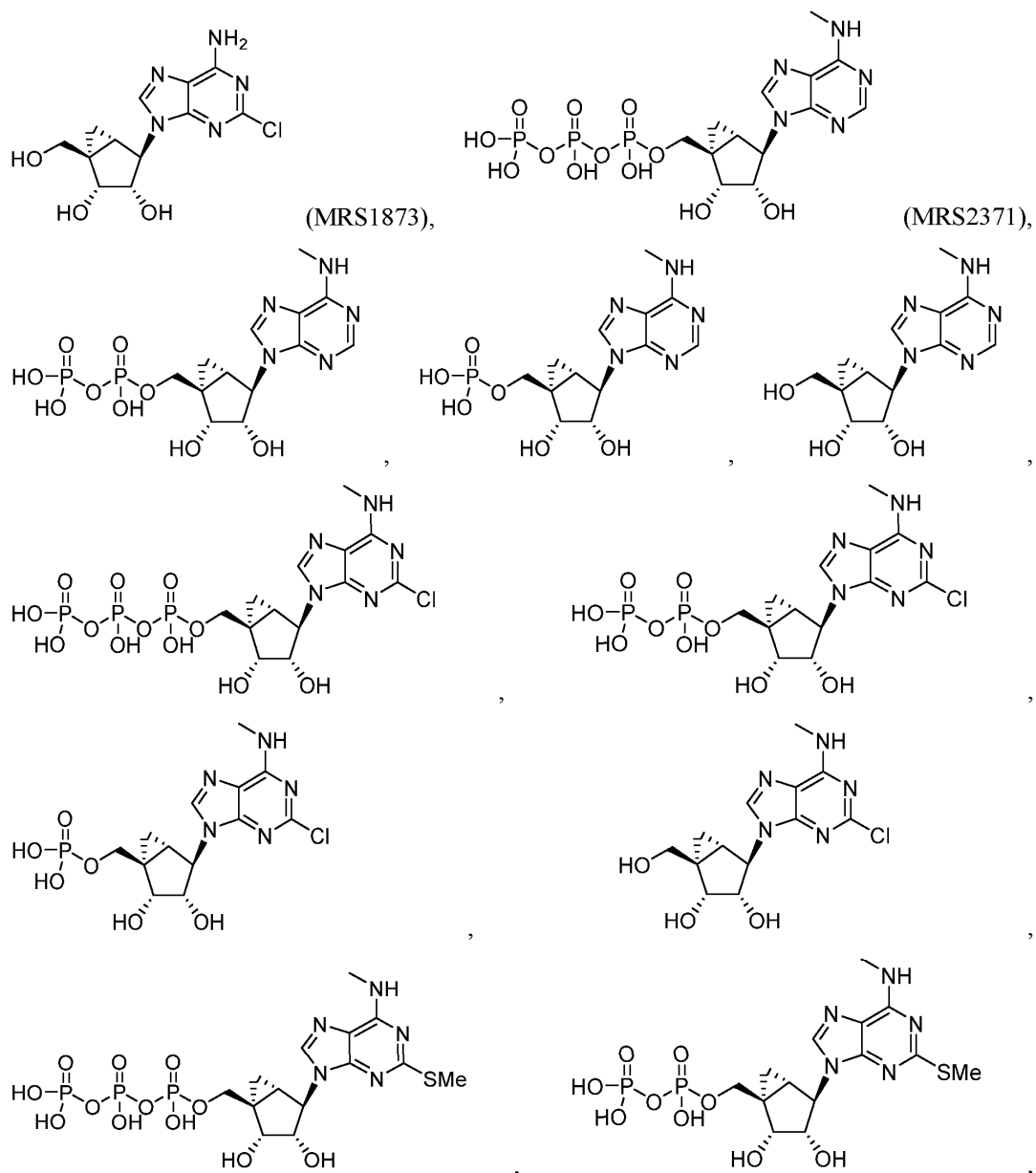
или их фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение выбрано из группы, состоящей из:

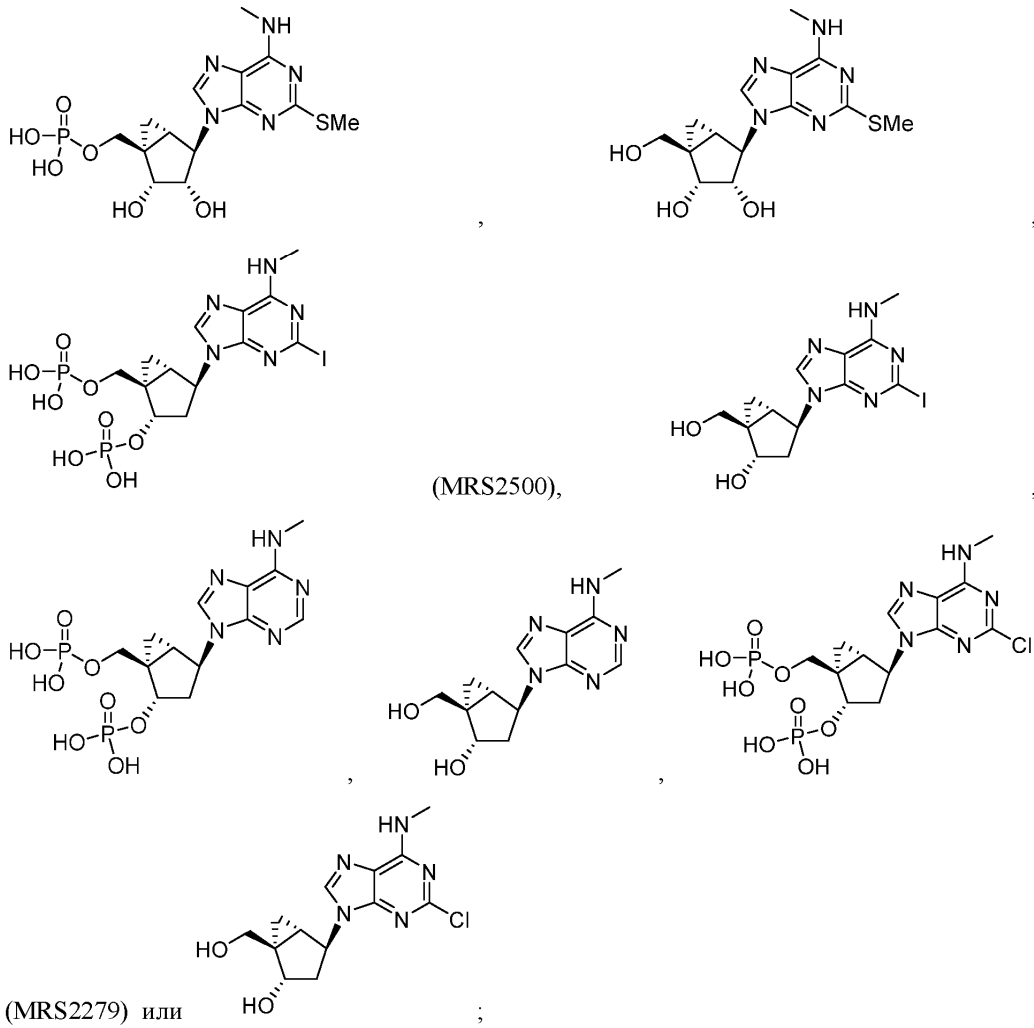


где каждое соединение может иметь "северную" или "южную" конформацию, или метанокарба-сахар может быть заменен на D-рибосахар; или его фармацевтически приемлемой соли; или его моно-, ди- или трифосфата или фармацевтически приемлемой соли указанного моно-, ди- или трифосфата. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанный метанокарба-сахар представляет собой D-(N)-метанокарба-сахар. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения метанокарба-сахар представляет собой D-(S)-метанокарба-сахар.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение выбрано из:

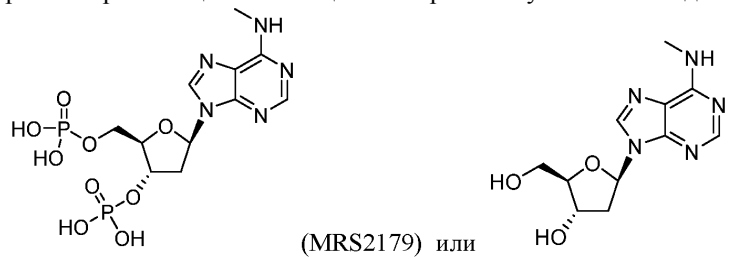






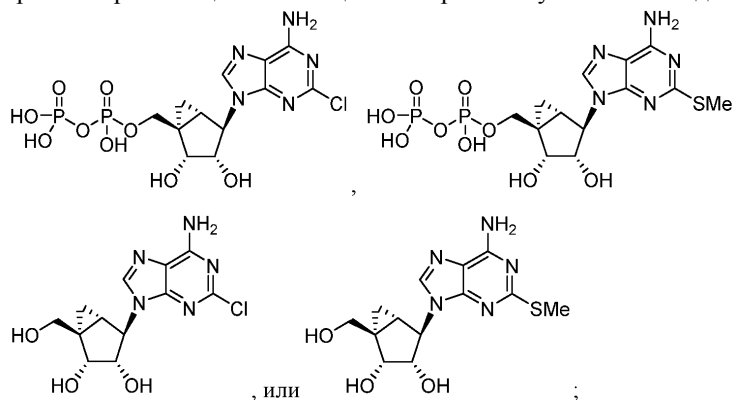
или их фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение выбрано из (N)-метанокарбануклеозида, такого как описанные выше; или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение выбрано из:



или их фармацевтически приемлемой соли.

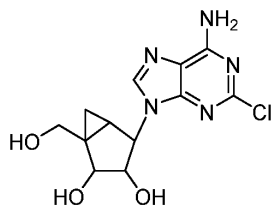
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение выбрано из:



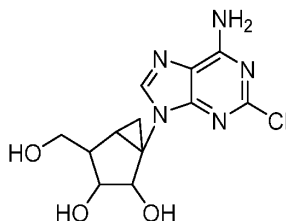


или их фармацевтически приемлемой соли.

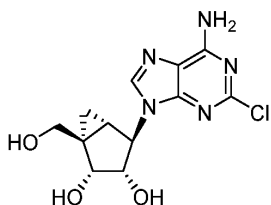
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой

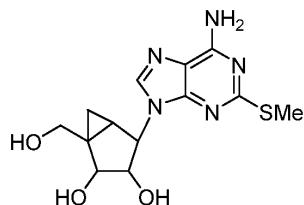


или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой

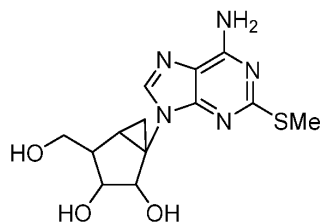


или его фармацевтически приемлемую соль.

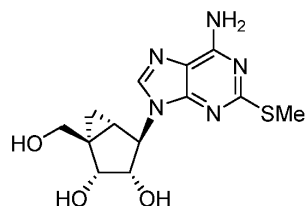
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой



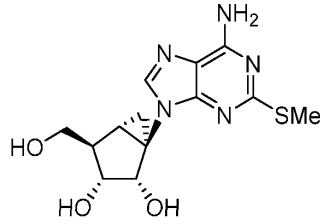
или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой



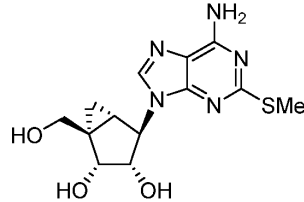
или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой



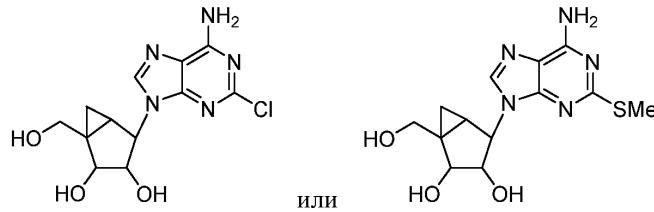
или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой



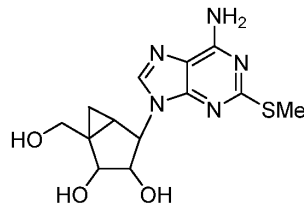
или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой



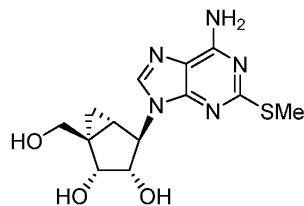
В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение, описанное в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый наполнитель. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой



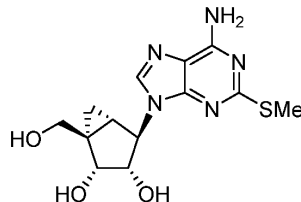
или их фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой



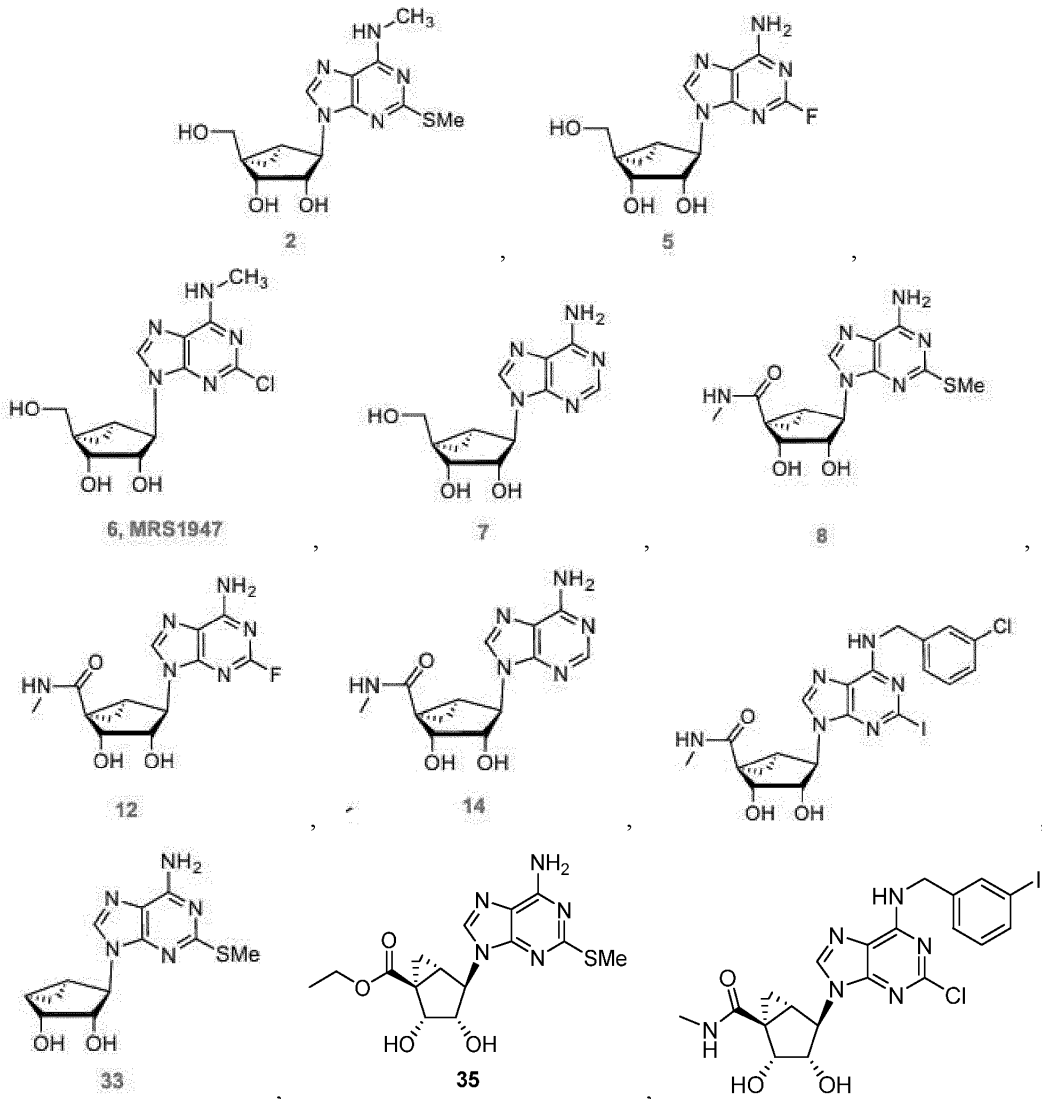
или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой



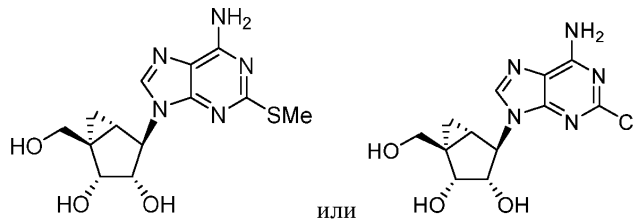
или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой



В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение выбрано из соединений, представленных на фиг. 15, или их фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение выбрано из:

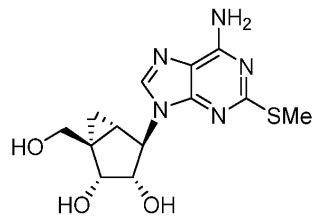


(MRS1898) или MRS1873; или их фармацевтически приемлемых солей. В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения повреждения головного мозга или центральной нервной системы (ЦНС), выбранного из черепно-мозговой травмы (ЧМТ) или инсульта, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества соединения, выбранного из:



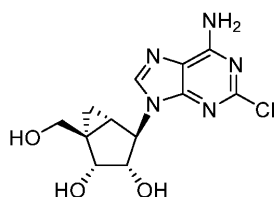
его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтически приемлемой композиции, содержащей указанное соединение.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное повреждение или состояние мозга или центральной нервной системы (ЦНС) представляет собой ЧМТ.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанная ЧМТ выбрана из сотрясения мозга, повреждения ударной волной, повреждения, полученного при участии в боевых действиях, или легкого, среднего или сильного удара по голове.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят в течение 24 часов после ЧМТ или инсульта.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят в течение 8 часов после ЧМТ или инсульта.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят в течение по меньшей мере первых 8-48 часов после ЧМТ или инсульта.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное повреждение или состояние мозга или центральной нервной системы (ЦНС) представляет собой инсульт.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят длительно для лечения инсульта в течение периода времени после возникновения инсульта до его устранения.

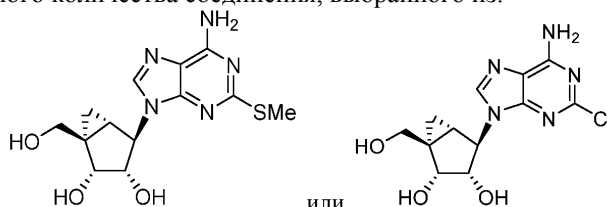
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения нейропротекция или нейрорепарация увеличивается у пациента по сравнению с пациентом, не получавшим лечения.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой частичный агонист смещенной активности в отношении аденозинового рецептора  $A_3$  человека ( $A_3R$ ).

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения  $A_3R$  частично агонизируется со смещением в сторону нейропротективных функций рецептора  $A_3R$ .

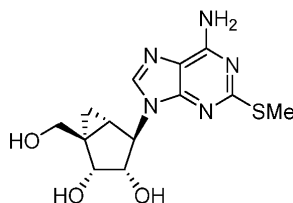
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят перорально, внутривенно или парентерально.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу усиления нейропротекции или нейрорепарации у пациента, который перенес ЧМТ или инсульт, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения, выбранного из:



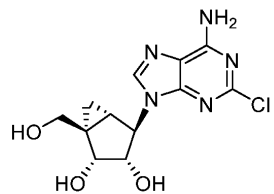
его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтически приемлемой композиции, содержащей указанное соединение.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанная нейропротекция или нейро-репарация уменьшает период восстановления после ЧМТ или инсульта по сравнению с пациентом, не получавшим лечения.

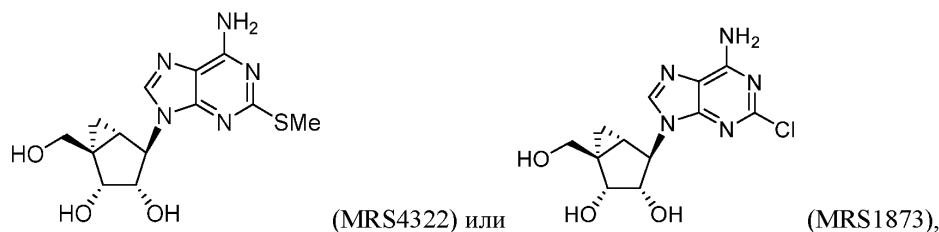
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой частичный агонист смещенной активности  $A_3$  аденозинового рецептора человека ( $A_3R$ ) и указанный  $A_3R$  частично агонизирован сосмещением в сторону нейропротективных функций указанного рецептора  $A_3R$ .

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят перорально, внутривенно или парентерально.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения несвязанная фракция указанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли в плазме крови составляет по меньшей мере 0,7 или несвязанная фракция в мозге составляет по меньшей мере 0,08, или и то, и другое.

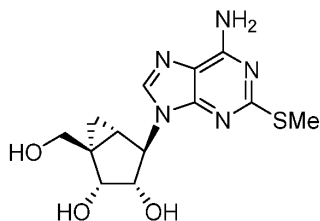
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения несвязанная фракция указанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли в плазме крови составляет по меньшей мере 0,7 или несвязанная фракция в мозге составляет по меньшей мере 0,08, или и то, и другое.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения повреждения, заболевания или состояния, выбранного из черепно-мозговой травмы (ЧМТ), инсульта, нейродегенеративного состояния, заболевания сердца или сердечно-сосудистого заболевания, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества агониста  $A_3$  аденозинового рецептора ( $A_3R$ ), выбранного из:



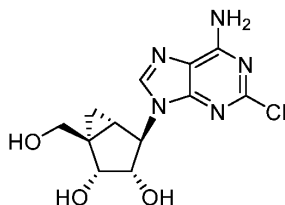
его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтически приемлемой композиции, содержащей указанное соединение.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное повреждение, заболевание или состояние представляет собой ЧМТ.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанная ЧМТ выбрана из сотрясения мозга, повреждения ударной волной, повреждения, полученного при участии в боевых действиях, или легкого, среднего или сильного удара по голове.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное повреждение, заболевание или состояние представляет собой инсульт, выбранный из ишемического инсульта, геморрагического инсульта, субарахноидального кровоизлияния, спазма сосудов головного мозга или переходящих нарушений мозгового кровообращения (ПНМК).

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное нейродегенеративное заболевание выбрано из болезни Альцгеймера (БА), болезни Паркинсона (БП), болезни Хантингтона (БХ),

рассеянного склероза (РС), бокового амиотрофического склероза (БАС), хронической травматической энцефалопатии (ХТЭ) или нейродегенеративного состояния, вызванного вирусом, алкоголизмом, опухолью, токсином или повторяющимися повреждениями головного мозга.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное повреждение, заболевание или состояние представляет собой болезнь Паркинсона.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное повреждение, заболевание или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера, мигрень, хирургическое вмешательство на головном мозге или неврологический побочный эффект, связанный с химиотерапией рака.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное заболевание сердца или сердечно-сосудистое заболевание выбрано из ишемии сердца, инфаркта миокарда, кардиомиопатии, ишемической болезни сердца, аритмии, миокардита, перикардита, стенокардии, гипертонической болезни сердца, эндокардита, ревматической болезни сердца, врожденного порока сердца или атеросклероза.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное заболевание сердца или сердечно-сосудистое заболевание представляет собой ишемию сердца или инфаркт миокарда.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят длительно для лечения инфаркта, ишемии сердца или инфаркта миокарда в течение периода времени с появления указанного повреждения до его устранения.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения нейропротекция или нейрорепарация увеличивается у пациента по сравнению с пациентом, не получавшим лечения.

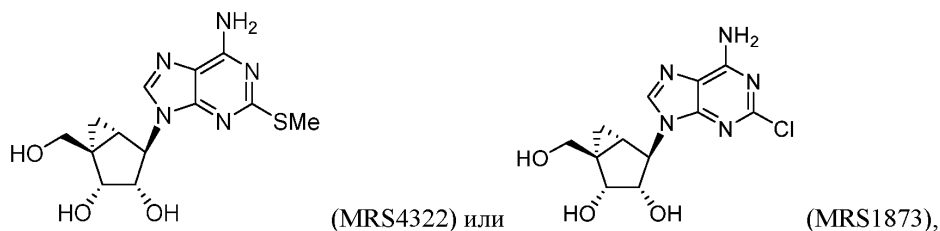
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанный  $A_3R$  агонизируется со смещением в сторону нейропротективных функций указанного рецептора  $A_3R$  посредством преимущественной активации внутриклеточной мобилизации кальция с меньшей активацией или без активации других  $A_3R$ -опосредованных путей или посредством преимущественной активации Gq11-опосредованной внутриклеточной мобилизации кальция, Gi-опосредованной модуляции продукции цАМФ или Gi-опосредованного фосфорилирования ERK1/2 и Akt.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанный  $A_3R$  частично агонизируется со смещением в сторону кардиопротективных функций указанного рецептора  $A_3R$  посредством преимущественной активации внутриклеточной мобилизации кальция с меньшей активацией или без активации других  $A_3R$ -опосредованных путей или посредством преимущественной активации Gq11-опосредованной внутриклеточной мобилизации кальция, Gi-опосредованной модуляции продукции цАМФ или Gi-опосредованного фосфорилирования ERK1/2 и Akt.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанный способ усиливает нейропротекцию или нейрорепарацию у пациента, который страдает неврологическим состоянием, возникшим в результате или связанным с химиотерапией рака или хирургическим вмешательством на головном мозге.

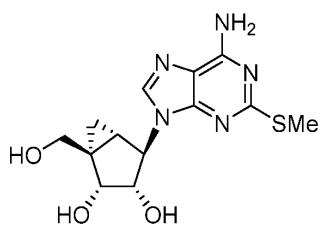
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят перорально.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу усиления нейропротекции или нейрорепарации у пациента, который перенес ЧМТ или инсульт, и лечения таким образом ЧМТ или инсульта, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества агониста  $A_3$  аденозинового рецептора ( $A_3R$ ), выбранного из:

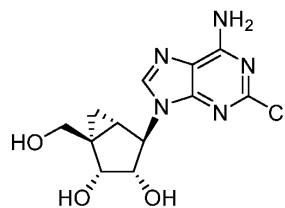


его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтически приемлемой композиции, содержащей указанное соединение.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу усиления кардиопротекции или регенерации поврежденной ткани сердца у пациента, который перенес ишемию сердца или инфаркт миокарда, и лечения таким образом ишемии сердца или инфаркта миокарда, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества агониста  $A_3$  аденозинового рецептором аденозина ( $A_3R$ ), выбранного из:



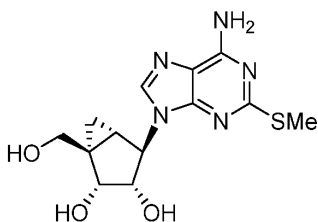
(MRS4322) или



(MRS1873),

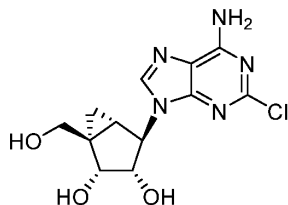
его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтически приемлемой композиции, содержащей указанное соединение.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанный период восстановления после ЧМТ, инсульта, ишемии сердца или инфаркта миокарда сокращается по сравнению с пациентом, не получавшим лечения.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанный  $A_3R$  частично агонизируется со смещением в сторону нейропротективных функций рецептора  $A_3R$ .

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанный  $A_3R$  частично агонизируется со смещением в сторону кардиопротективных функций рецептора  $A_3R$ .

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят перорально.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист  $A_3R$  со смещенной активностью с улучшенной кардиопротективной функцией по сравнению с полным агонистом  $A_3R$ .

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности  $A_3R$  с улучшенной кардиопротективной функцией по сравнению с полным агонистом  $A_3R$  за счет преимущественной активации одного или более из следующих  $A_3R$ -опосредованных путей:

активации Gq11-опосредованной внутриклеточной мобилизации кальция, Gi-опосредованной модуляции продукции цАМФ, Gi-опосредованного фосфорилирования ERK1/2 и Akt или модуляции активации бета-аррестина.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой агонист смещенной активности  $A_3R$  с улучшенной кардиопротективной функцией по сравнению с полным агонистом  $A_3R$  за счет преимущественной активации внутриклеточной мобилизации кальция с меньшей активацией или без активации других  $A_3R$ -опосредованных путей.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение представляет собой частичный агонист  $A_3R$  с улучшенной кардиопротективной функцией по сравнению с полным агонистом  $A_3R$ .

Количество соединения согласно настоящему изобретению (то есть активного агента), которое должно присутствовать в композиции для применения в способе согласно настоящему изобретению или в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, обычно будет терапевтически эффективным количеством. "Терапевтически эффективное количество" или доза (или "эффективное количество") относится к такому количеству активного агента, которое достаточно для достижения желаемого терапевтического результата, такого как активация нейропротекции, нейрорепаляции и/или улучше-

ние когнитивной или неврологической функции. Токсичность и терапевтическую эффективность композиций активных агентов можно определить с помощью процедур, известных в данной области техники, в клеточных культурах или экспериментальных животных, например, для определения ЛД<sub>50</sub> (доза, летальная для 50% испытуемой группы) и ЭД<sub>50</sub> (доза, терапевтически эффективная у 50% испытуемой группы). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами является терапевтическим показателем, и оно может быть выражено как соотношение ЛД<sub>50</sub>/ЭД<sub>50</sub>. Предпочтительны композиции, которые демонстрируют большие терапевтические показатели. Данные, полученные с помощью анализов клеточной культуры и исследований на животных, можно использовать при разработке диапазона доз для применения у людей. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения дозировка таких композиций находится в диапазоне циркулирующих концентраций, которые включают ЭД<sub>50</sub> с небольшой токсичностью или без нее. Доза может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от применяемой лекарственной формы и применяемого способа введения.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанная эффективная доза и/или желаемый терапевтический эффект устанавливаются путем сравнения когнитивной функции или другого параметра пациента или испытуемого для по меньшей мере двух измерений; однако также можно использовать более двух измерений. Начальная оценка когнитивной функции устанавливает исходную базовую линию для испытуемого или пациента. Когнитивную функцию можно измерить с помощью установленного когнитивного теста, такого как тест на отсроченное припоминание по пересмотренной шкале памяти Векслера. Повторный тест проводится после лечения, полученная оценка представляет собой вторую оценку. Количество признается эффективным, когда сравнение второй оценки с первой оценкой демонстрирует улучшение по меньшей мере примерно на 1%. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения улучшение когнитивной функции, измеряемое с помощью теста на отсроченное припоминание по пересмотренной шкале памяти Векслера, составляет примерно от 1% до 20%. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное составляет примерно от 1% до 10%. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное составляет примерно от 1% до 5%. Специалисту в данной области понятно, что другие способы определения улучшения когнитивной функции в равной степени применимы, если они не измеряют стадии деменции. Соответственно, настоящее изобретение охватывает способы улучшения когнитивной или неврологической функции путем введения эффективного количества описанного в настоящем документе соединения субъекту, нуждающемуся в этом, при этом указанное усиление неврологической и когнитивной функции измеряется как увеличение оценки на от 1% до 20% по тесту на отсроченное припоминание по пересмотренной шкале памяти Векслера.

Описанные в настоящем документе способы лечения могут включать введение описанного в настоящем документе соединения по мере необходимости для получения желаемого терапевтического эффекта. Указанную композицию можно вводить так долго, как это необходимо для поддержания желаемого терапевтического эффекта. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят на протяжении примерно от 1 до 12 месяцев. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят на протяжении от 1 до 6 месяцев. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное соединение вводят на протяжении от 1 до 3 месяцев.

В одном аспекте настоящего изобретения описанное в настоящем документе соединение вводят в количестве от примерно 5 мг/день до 10 г/день. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения каждая доза указанного соединения составляет от примерно 5 мг на дозу до 10 г на дозу. Например, удовлетворительные результаты получают при пероральном введении описанного в настоящем документе соединения в дозах от примерно 0,05 до 10 мг/кг/день, от примерно 0,1 до 7,5 мг/кг/день, от примерно 0,1 до 2 мг/кг/день, или 0,5 мг/кг/день при введении разово или в разделенных дозах от 2 до 4 раз в сутки. Для парентерального введения, например, внутривенно капельно или инфузией, можно применять дозы от примерно 0,01 до 5 мг/кг/сутки, от примерно 0,05 до 1,0 мг/кг/сутки и от примерно 0,1 до 1,0 мг/кг/сутки. Таким образом, подходящие суточные дозы для пациентов составляют от примерно 2,5 до 500 мг перорально, от примерно 5 до 250 мг перорально, от примерно 5 до 100 мг перорально или от примерно 0,5 до 250 мг внутривенно, от примерно 2,5 до 125 мг внутривенно и от примерно 2,5 до 50 мг внутривенно.

### 3. Применение, состав и введение.

Фармацевтически приемлемые композиции.

Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к композиции, содержащей соединение по данному изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или наполнитель. В конкретных вариантах реализации настоящего изобретения композицию согласно настоящему изобретению готовят для введения пациенту, нуждающемуся в такой композиции. В конкретных вариантах реализации настоящего изобретения композицию согласно настоящему изобретению готовят для перорального введения пациенту.

Используемый в настоящем документе термин "пациент" означает животное, предпочтительно млекопитающее и наиболее предпочтительно человека. Термин "фармацевтически приемлемый носитель,



адьювант или наполнитель" относится к нетоксичным носителям, адьювантам или наполнителям, которые не разрушают фармакологическую активность соединения, с которым они приготовлены. Фармацевтически приемлемые носители, адьюванты или носители, которые могут быть использованы в композициях настоящего изобретения, включают, но не ограничиваются ими, ионообменники, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как сывороточный альбумин человека, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновую кислоту, сорбат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как протамина сульфат, динатрия гидрофосфат, вторичный кислый фосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидную двуокись кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, карбоксиметилцеллюлоза натрия, полиакрилаты, воски, полиэтилен-полиоксипропилен-блок-полимеры, полиэтиленгликоль и ланолин. "Фармацевтически приемлемое производное" означает любую нетоксичную соль, сложный эфир, соль сложного эфира или другое производное соединения согласно настоящему изобретению, которое при введении реципиенту способно обеспечить, прямо или косвенно, соединение согласно настоящему изобретению или ингибирующий активный метаболит или его остаток.

Композиции по настоящему изобретению можно вводить перорально, парентерально, при помощи ингаляционного спрея, местно, ректально, назально, буккально, вагинально или при помощи имплантированного резервуара. Используемый в настоящем документе термин "парентеральный" включает в себя подкожную, внутривенную, внутримышечную, внутрисуставную, внутрисиновиальную, интрастернальную, интратекальную, внутрипеченочную, внутрипочечную и внутричерепную инъекцию или инфузию. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанные композиции вводят перорально, внутрибрюшинно или внутривенно. Стерильные инъекционные формы композиций согласно настоящему изобретению могут представлять собой водную или масляную суспензию. Эти суспензии могут быть составлены в соответствии с методиками, известными в данной области техники, с применением подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов. Стерильная инъекционная форма может также представлять собой стерильный инъекционный раствор или суспензию в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, как раствор в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых носителей и растворителей, которые можно использовать, можно указать воду, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, стерильные нелетучие масла традиционно могут быть использованы в качестве растворителя или суспендирующей среды.

С этой целью может быть использовано любое мягкое нелетучее масло, в том числе синтетические моно- или диглицериды. Жирные кислоты, такие как олеиновая кислота и ее глицеридные производные, пригодны для приготовления инъекционных лекарственных средств, также пригодны натуральные фармацевтически приемлемые масла, такие как оливковое масло или касторовое масло, особенно в их полиоксиэтилированных вариантах. Эти масляные растворы или суспензии могут также содержать спиртовой разбавитель или диспергатор с длинной цепью, такой как карбоксиметилцеллюлоза или подобные диспергирующие агенты, которые обычно используются в рецептуре фармацевтически приемлемых дозированных лекарственных форм, включая эмульсии и суспензии. Для целей приготовления композиции можно применять также другие обычно используемые поверхностно-активные вещества, такие как Tweens, Spans и другие эмульгирующие агенты или усилители биодоступности, которые обычно используются при изготовлении фармацевтически приемлемых твердых, жидких или других стандартных дозированных лекарственных форм.

Фармацевтически приемлемые композиции согласно настоящему изобретению можно вводить перорально в любой перорально приемлемой стандартной дозированной лекарственной форме, включая, но не ограничиваясь ими, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. В случае таблеток для перорального применения, обычно используемые носители включают лактозу и кукурузный крахмал. Также обычно добавляют смазывающие агенты, такие как стеарат магния. Для перорального введения в форме капсулы, пригодные разбавители включают лактозу и высушенный кукурузный крахмал. Когда для перорального применения требуются водные суспензии, активный ингредиент комбинируют с эмульгирующими и суспендирующими агентами. При желании также могут быть добавлены определенные подсластители, ароматизаторы или красители. Альтернативно, фармацевтически приемлемые композиции согласно настоящему изобретению можно вводить в форме суппозиториев для ректального введения. Их можно получать путем смешивания агента с подходящим не раздражающим вспомогательным веществом, которое является твердым при комнатной температуре, но жидким при ректальной температуре и, следовательно, расплавляется в прямой кишке с высвобождением лекарственного средства. Такие материалы включают масло какао, пчелиный воск и полиэтиленгликоли.

Фармацевтически приемлемые композиции согласно настоящему изобретению можно также вводить местно, особенно когда цель лечения включает области или органы, легко доступные для местного применения, включая заболевания глаз, кожи или нижнего отдела кишечного тракта. Для каждой из этих областей или органов легко приготовить подходящие составы для местного применения.

Местное применение для нижнего отдела кишечного тракта можно осуществлять в виде ректального суппозитория (см. выше) или в подходящем составе для клизмы. Также можно применять трансдер-

мальные пластыри для местного применения. Для местного применения предоставленные фармацевтически приемлемые композиции могут быть приготовлены в виде подходящей мази, содержащей активный компонент, суспендированный или растворенный в одном или нескольких носителях. Носители для местного введения соединений согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, минеральное масло, жидкий вазелин, белый вазелин, пропиленгликоль, полиоксиэтилен, соединение полиоксипропилена, эмульгирующий воск и воду. Кроме того, представленные фармацевтически приемлемые композиции могут быть приготовлены в виде подходящих лосьона или крема, содержащих активные компоненты, суспендированные или растворенные в одном или более фармацевтически приемлемом носителе. Подходящие носители включают, но не ограничиваются ими, минеральное масло, сорбитанмоностеарат, полисорбат 60, воск цетиловых эфиров, цетеариловый спирт, 2-октилдодеканол, бензиловый спирт и воду.

Для офтальмологического применения фармацевтически приемлемые композиции согласно настоящему изобретению можно приготовить в виде микронизированных суспензий в изотоническом стерильном физиологическом растворе с отрегулированным рН или в виде растворов в изотоническом стерильном физиологическом растворе с отрегулированным рН, с консервантом, таким как хлорид бензилалкония, или без него. Альтернативно, для офтальмологических применений указанные фармацевтически приемлемые композиции можно приготовить в виде мази, например, в вазелине. Фармацевтически приемлемые композиции согласно настоящему изобретению также можно вводить с помощью назального аэрозоля или ингаляции. Такие композиции готовят в соответствии с методиками, хорошо известными в области фармацевтических композиций, и они могут быть приготовлены в виде растворов в физиологическом растворе с использованием бензилового спирта или других подходящих консервантов, промоторов абсорбции для улучшения биодоступности, фторуглеродов и/или других традиционных солюбилизующих или диспергирующих агентов.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения фармацевтически приемлемые композиции согласно настоящему изобретению готовят для перорального введения. Такие композиции можно вводить с пищей или без нее. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения фармацевтически приемлемые композиции согласно настоящему изобретению вводят без пищи. В других вариантах реализации настоящего изобретения фармацевтически приемлемые композиции согласно настоящему изобретению вводят с пищей.

В других вариантах реализации настоящего изобретения фармацевтически приемлемые композиции согласно настоящему изобретению готовят для внутривенного (в/в) введения.

Количество соединения согласно настоящему изобретению, которое можно комбинировать с материалами носителями с получением композиции в виде стандартной дозированной лекарственной формы, будет варьироваться в зависимости от пациента и конкретного способа введения. Предпочтительно композиции согласно настоящему изобретению должны быть составлены таким образом, чтобы пациенту, получающему эти композиции, можно было вводить дозу ингибитора, составляющую от 0,01 до 100 мг/кг массы тела/день.

Однако следует понимать, что конкретный уровень дозы и режим дозирования для любого отдельного пациента будет зависеть от множества факторов, включая активность определенного применяемого соединения, возраст пациента, массу тела, общее состояние здоровья, пол, диету, время введения и скорость экскреции, комбинации лекарственных средств, от мнения лечащего врача и от степени тяжести конкретного заболевания, подлежащего лечению. Количество соединения согласно настоящему изобретению в указанной композиции также будет зависеть от конкретного соединения в композиции.

Применение соединений и фармацевтически приемлемых композиций.

Соединения и композиции, описанные в настоящем документе, обычно пригодны для лечения различных заболеваний и состояний, таких как повреждения головного мозга и нейродегенеративные состояния, и для различных способов, описанных в настоящем документе.

Активность соединения, применяемого в настоящем изобретении, можно анализировать *in vitro*, *in vivo* или в клеточной линии. Анализы *in vitro* включают анализы, которые определяют модуляцию или связывание с белком. Подробные условия анализа соединения изложены в приведенных ниже примерах.

Используемые в настоящем документе термины "лечение" и "лечить" относятся к обращению вспять, облегчению, задержке начала или замедлению развития заболевания или расстройства или одного или нескольких их симптомов, как описано в данном документе. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения лечение можно назначать после развития одного или нескольких симптомов. В других вариантах реализации лечение можно назначать при отсутствии симптомов. Например, лечение может быть назначено восприимчивому индивидууму до появления симптомов (например, с учетом истории симптомов и/или с учетом генетических или других факторов восприимчивости). Лечение также можно продолжать после устранения симптомов, например, для предотвращения или задержки их рецидива.

Соединения и композиции в соответствии со способом по настоящему изобретению можно вводить с использованием любого количества и любого пути введения, эффективного для лечения или уменьшения тяжести описанного в настоящем документе заболевания или состояния, или связанного состояния

или симптома. Точное требуемое количество будет варьироваться от субъекта к субъекту, в зависимости от вида, возраста и общего состояния субъекта, серьезности заболевания или состояния, конкретного применяемого агента, способа его введения и тому подобного. Соединения согласно настоящему изобретению предпочтительно приготавливают в стандартной дозированной лекарственной форме для простоты введения и однородности дозировки. Используемое в настоящем документе выражение "стандартная дозированная лекарственная форма" относится к физически дискретной единице агента, подходящей для пациента, подлежащего лечению. Однако следует понимать, что общее ежедневное применение соединений и композиций согласно настоящему изобретению будет определяться лечащим врачом в рамках здравого медицинского суждения. Конкретный эффективный уровень дозы для любого конкретного пациента или организма будет зависеть от множества факторов, включая заболевание, подвергающееся лечению, и тяжесть указанного заболевания; активность конкретного применяемого соединения; конкретная применяемая композиция;

возраст, масса тела, общее состояние здоровья, пол и рацион пациента; время введения, способ введения и скорость экскреции конкретного применяемого соединения; продолжительность лечения; препараты, применяемые в комбинации или совпадающие с применением конкретного соединения, и подобные факторы, хорошо известные в медицине. Используемый в настоящем документе термин "пациент" означает животное, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения млекопитающее и в конкретных других вариантах реализации человека.

Фармацевтически приемлемые композиции согласно настоящему изобретению можно вводить людям и другим животным перорально, сублингвально, ректально, парентерально, интрацестерально, интравагинально, внутривнутрибрюшинно, местно (например, при помощи порошков, мазей или капель), внутриглазно (например, в виде глазных капель), буккально, в виде орального или назального спрея или тому подобного, в зависимости от тяжести заболевания или состояния, подлежащего лечению. В некоторых вариантах реализации соединения согласно настоящему можно вводить перорально или парентерально в дозах от примерно 0,01 мг/кг до примерно 50 мг/кг или от примерно 1 мг/кг до примерно 25 мг/кг массы тела субъекта в сутки один или несколько раз в сутки для получения желаемого терапевтического эффекта.

Жидкие лекарственные формы для перорального введения представляют собой, но не ограничиваются ими, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активным соединениям жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно применяемые в данной области техники, такие как, например, вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, зародышевое, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры сорбитана и жирных кислот и их смеси. Кроме инертных разбавителей, указанные композиции для перорального приема могут также содержать адьюванты, такие как смачивающие агенты, эмульгаторы и суспендирующие агенты, подсластители, вкусовые и ароматизирующие агенты.

Составы для инъекций, например, стерильные водные или масляные суспензии для инъекций можно приготовить в соответствии с известным уровнем техники с использованием подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов. Стерильный состав для инъекций может также представлять собой стерильный инъекционный раствор, суспензию или эмульсию в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых носителей и растворителей, которые можно использовать, можно указать воду, раствор Рингера, удовлетворяющий требованиям или превышающий требования по чистоте, установленные Фармакопеей США, и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, стерильные нелетучие масла традиционно могут быть использованы в качестве растворителя или суспендирующей среды. С этой целью можно применять любое мягкое нелетучее масло, в том числе синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, в приготовлении составов для инъекций также можно применять жирные кислоты, такие как олеиновая кислота.

Составы для инъекций можно стерилизовать, например, с помощью фильтрации через бактериальный фильтр или включением стерилизующих агентов в форме твердых стерильных композиций, которые можно растворять или диспергировать в стерильной воде или другой стерильной среде для инъекций перед использованием.

Чтобы продлить действие соединения согласно настоящему изобретению, часто желательно замедлить абсорбцию соединения при подкожной или внутримышечной инъекции. Это может быть достигнуто путем использования жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала с плохой растворимостью в воде. Скорость абсорбции соединения зависит от скорости его растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристалла и кристаллической формы. Альтернативно, отсроченная абсорбция парентерально вводимой формы соединения достигается за счет растворения или суспендирования соединения в масляном носителе. Формы инъекций замедленного всасывания получают путем

формирования микрокапсульных матриц соединения в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения соединения к полимеру и природы конкретного применяемого полимера можно контролировать скорость высвобождения соединения. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают полиортоэфир и полиангидриды. Составы для инъекций замедленного всасывания также получают путем включения соединения в липосомы или микроэмульсии, которые совместимы с тканями организма. Композиции для ректального или вагинального введения предпочтительно представляют собой суппозитории, которые можно получить путем смешивания соединения согласно настоящему описанию с подходящими не раздражающими эксципиентами или носителями, такими как масло какао, полиэтиленгликоль или воск для суппозитория, которые являются твердыми при комнатной температуре, но становятся жидкими при температуре тела и, следовательно, расплавляются в прямой кишке или вагинальной полости и высвобождают активное соединение.

Твердые лекарственные формы для перорального введения включают капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых лекарственных формах активное соединение смешано с по меньшей мере одним инертным, фармацевтически приемлемым наполнителем или носителем, таким как цитрат натрия или дикальцийфосфат и/или а) наполнителями или сухими разбавителями, такими как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота, б) связующими агентами, такими как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и гуммиарабик, с) увлажнителями, такими как глицерин, d) дезинтегрирующими агентами, такими как агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или крахмал из тапиоки, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия, e) замедляющими растворение агентами, такими как парафин, f) ускорителями абсорбции, такими как четвертичные аммониевые соединения, g) смачивающими агентами, такими как, например, цетиловый спирт и моностеарат глицерина, h) абсорбентами, такими как каолин и бентонитовая глина, и i) смазывающими агентами, такими как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердыми полиэтиленгликолями, лаурилсульфатом натрия и их смесями. В случае капсул, таблеток и пилюль лекарственная форма может также содержать буферные агенты. Твердые композиции подобного типа можно также использовать в качестве наполнителей в мягких и твердых заполненных желатиновых капсулах с применением таких наполнителей, как лактоза или молочный сахар, а также полиэтиленгликолей с высокой молекулярной массой и подобными. Твердые лекарственные формы таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул можно получать с покрытиями и оболочками, такими как энтеросолюбильные покрытия и другие покрытия, хорошо известные в данной области приготовления фармацевтических препаратов. Они могут необязательно содержать замутняющие агенты и могут также иметь такой состав, что они высвобождают активный ингредиент(ы) только в определенной части кишечного тракта, необязательно, замедленным способом. Примеры капсулирующих композиций, которые можно применять, включают полимерные вещества и воски. Твердые композиции подобного типа можно также использовать в качестве наполнителей в мягких и твердых заполненных желатиновых капсулах с применением таких наполнителей, как лактоза или молочный сахар, а также полиэтиленгликолей с высокой молекулярной массой и подобными.

Активные соединения также могут быть в микроинкапсулированной форме с одним или несколькими наполнителями, как указано выше. Твердые лекарственные формы таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул можно получать с покрытиями и оболочками, такими как энтеросолюбильные покрытия, контролирующее высвобождение покрытия и другие покрытия, хорошо известные в данной области приготовления фармацевтических препаратов. В таких твердых стандартных дозированных формах активное соединение может быть смешано с по меньшей мере одним инертным разбавителем, таким как сахароза, лактоза или крахмал. Такие стандартные дозированные лекарственные формы могут также содержать, как это принято в обычной практике, дополнительные вещества, отличные от инертных разбавителей, например, смазывающие вещества для таблетирования и другие вспомогательные средства для таблетирования, такие как стеарат магния и микрокристаллическую целлюлозу. В случае капсул, таблеток и пилюль стандартные дозированные лекарственные формы могут также содержать буферные агенты. Они могут необязательно содержать замутняющие агенты и могут также иметь такой состав, что они высвобождают активный ингредиент(ы) только в определенной части кишечного тракта, необязательно, замедленным способом. Примеры капсулирующих композиций, которые можно применять, включают полимерные вещества и воски.

Лекарственные формы для местного или трансдермального введения соединения по данному изобретению включают мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, порошки, растворы, спреи, ингаляторы или пластыри. Активный компонент смешивают в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и любыми необходимыми консервантами или буферами, которые могут потребоваться. Офтальмологический состав, ушные капли и глазные капли также рассматриваются как входящие в объем настоящего изобретения.

Кроме того, настоящее изобретение предусматривает использование трансдермальных пластырей, которые имеют дополнительное преимущество обеспечения регулируемой доставки соединения в тело. Такие лекарственные формы могут быть изготовлены путем растворения или диспергирования соединения в соответствующей среде. Усилители абсорбции также могут быть использованы для увеличения

потока соединения через кожу. Скорость может регулироваться либо с помощью регулирующей скорости мембраны или диспергированием соединения в полимерной матрице или геле.

В композициях по настоящему изобретению в зависимости от конкретного состояния или заболевания, подлежащего лечению, также можно также включать дополнительные терапевтические агенты, которые обычно применяются для лечения этого состояния. Используемые здесь дополнительные терапевтические агенты, которые обычно вводят для лечения конкретного заболевания или состояния, известны как "подходящие для заболевания или состояния, подлежащего лечению".

Как показано в приведенных ниже примерах, в некоторых примерах реализации настоящего изобретения соединения получают и применяют в соответствии со следующими общими способами. Следует иметь в виду, что, хотя общие способы отражают синтез некоторых соединений согласно настоящему изобретению, следующие общие способы, а также другие способы, известные любому специалисту в данной области техники, можно применять ко всем соединениям и подклассам и видам каждого из этих соединений, как описано в настоящем документе.

Содержание каждого документа, цитируемого в описании, полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

### Примеры

Пример 1. Фармакокинетика MRS4322 при внутрибрюшинном введении мышам.

Цель.

Это исследование было разработано для определения концентраций MRS4322 в плазме крови и мозге после внутрибрюшинного введения дозы, используемой в моделях фототромбоза и черепно-мозговой травмы мыши.

Способы.

Химические реактивы: MRS4322 был получен благодаря любезности доктора Кена Якобсона из Национального института диабета, болезней органов пищеварения и почек (National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, США). Толбутамид аналитического качества был получен из коммерческих поставок в Seventh Wave Laboratories (Maryland Heights, MO, США). Все другие химические вещества были получены от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, США).

Животные: В этом исследовании использовали самок мышей C57BL/6J весом примерно 0,02 кг, предоставленных Центром медицинских наук университета Техаса (University of Texas Health Sciences Center, San Antonio, TX, США). Все исследования проводились в соответствии с утвержденными Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию протоколами Центра медицинских наук университета Техаса.

Введение лекарственных средств: MRS4322 солибилизовали в ДМСО, а затем разбавляли физиологическим раствором с получением дозирочного раствора. Конечная концентрация дозирочного раствора MRS4322 составляла 100 мкМ. 100 мкл дозирочного раствора вводили внутрибрюшинно каждой мыши на 20 г веса тела; MRS4322 вводили внутрибрюшинно в дозе 0,16 мг/кг или 0,5 мкмоль/кг. В каждый из моментов времени MRS4322 вводили трем мышам.

Отбор проб ткани: Образцы крови и головного мозга получали через 0, 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2 и 8 часов после введения дозы. В каждый из моментов времени отбора проб мышей подвергали эвтаназии в камере с окисью углерода (3 мыши на каждую временную точку). Забор цельной крови проводили путем пункции сердца в пробирки Microtainer, содержащие гепарин, образцы сразу же центрифугировали с получением плазмы; плазму хранили при температуре -80°C. В каждый из моментов времени образцы целого мозга были получены путем декапитации, затем мозг промывали в охлажденном льдом забуференном фосфатом физиологическом растворе и взвешивали. Затем образцы мозга немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C.

Биоанализ.

Концентрации MRS4322 в плазме и в мозге определяли методом ЖХ-МС/МС с использованием толбутамида в качестве внутреннего стандарта. В следующей таблице приведены используемые условия ЖХ и МС/МС:

## Биоаналитические методы определения концентрации MRS4322 в плазме и мозге

<b>Биоаналитические методы</b>			
<b>Системные компоненты</b>			
Модуль	Производитель	Модель	
ВЭЖХ	Shimadzu	Бинарные насосы Prominence LC-20AD	
Автопроботборник	Leap	Prominence SiI-30AC	
Масс-спектрометр	AB Sciex	4000 Qtrap	
<b>Метод ВЭЖХ</b>			
Колонка	Phenomenex Kinetex C18 (2,1 x 50 мм, 2,6 мкм)		
Элюирование	Градиент, 0,4 мл/мин		
	Мобильная фаза А: 0,1% муравьиная кислота		
	Мобильная фаза В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле		
<b>Обнаружение и калибровка MRS4322 в плазме мыши по МС</b>			
Название пика: Толбутамид			
Использование в качестве внутреннего стандарта			
Q1/Q3 массы: 271,20/155,20 Да			
Название пика: MRS4322			
Внутренний стандарт: Толбутамид			
Q1/Q3 массы: 324,10/182,00 Да			
Подгонка	Линейн.	Взвешивание	1 / (x * x)
Точка пересечения	0,000447		
Наклон	0,00141		
Коэффициент корреляции	0,9996		
Область применения			
<b>Обнаружение и калибровка MRS4322 в плазме мыши по МС</b>			
Название пика: Толбутамид			
Использование в качестве внутреннего стандарта			
Q1/Q3 массы: 271,20/155,20 Да			
Название пика: MRS4322			
Внутренний стандарт: Толбутамид			
Q1/Q3 массы: 324,10/182,00 Да			
Подгонка	Линейн.	Взвешивание	1 / (x * x)
Точка пересечения	0,0000465		
Наклон	0,000883		
Коэффициент корреляции	0,9996		
Область применения			

Для каждого тканевого матрикса были созданы стандартные кривые и определены концентрации НПКО/ВПКО. Диапазон калибровки для стандартной кривой концентрации MRS4322 в плазме составлял 2,42-242 нг/мл. Диапазон калибровки для концентраций MRS4322 в мозге составлял 2,41-233 нг/мл.

Для биоанализа концентраций MRS4322 в головном мозге образцы мозга гомогенизировали в охлажденном льдом физиологическом растворе с фосфатным буфером в 4-кратном разведении. Аликвоты

полученного разбавленного гомогената мозга обрабатывали ацетонитрилом и анализировали методом ЖХ-МС/МС. Из-за 4-кратного разбавления гомогената диапазон калибровки стандартной кривой для MRS4322 в мозге был переведен в 9,64-932 нг/г. В нескольких образцах MRS4322 был обнаруживаемым, значение было ниже НПКО для мозга, составляющего 9,64 нг/г, но было выше фона; в этих случаях конечная концентрация в мозге была получена экстраполированием на основе высоты пика МС.

Результаты.

После внутрибрюшинного введения мышам определяли концентрации MRS4322 в плазме и в образцах головного мозга (фиг. 1А и табл. 2). Следует отметить, что, как описано в примере 11 ниже и показано на фиг. 1В и 16, концентрации MRS4322 были обнаружены в образцах плазмы и головного мозга новорожденных поросят. После внутривенного введения новорожденным поросьятам определяли концентрации MRS4322 в образцах плазмы, головного мозга, внеклеточной жидкости головного мозга и спинномозговой жидкости (фиг. 1В и фиг. 16, табл. 13).

Таблица 2  
Концентрация MRS4322 в плазме и мозге мышей после внутрибрюшинного введения

Группа	Матрица	Испытываемое соединение	Доза (мг/кг)	Время (ч)	Концентрация в плазме (нг/мл) по субъектам					
					A	B	C	Среднее	СО	N
1	Плазма	MRS4322	0,16	0	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				0,083	40,2	42,5	65,8	49,5	14,2	3
				0,25	37,5	41,6	46,3	41,8	4,40	3
				0,5	14,8	26,8	21,6	21,1	6,00	3
				1	7,35	4,23	85,0*	5,79	NA	2
				2	0,539 <sup>†</sup>	0,638 <sup>†</sup>	1,15 <sup>†</sup>	0,776	0,328	3
				8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
Группа	Матрица	Испытываемое соединение	Доза (мг/кг)	Время (ч)	Концентрация в плазме (нг/г) по субъектам					
					A	B	C	Среднее	СО	N
1	Мозг	MRS4322	0,16	0	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				0,083	2,04 <sup>†</sup>	2,18 <sup>†</sup>	2,55 <sup>†</sup>	2,11	0,100	3
				0,25	3,08 <sup>†</sup>	3,03 <sup>†</sup>	3,43 <sup>†</sup>	3,06	0,040	3
				0,5	1,77 <sup>†</sup>	3,00 <sup>†</sup>	1,81 <sup>†</sup>	2,39	0,870	3
				1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0

BLQ = ниже предела количественного определения (2,40 нг/мл для плазмы, 9,64 нг/г для мозга из-за четырехкратного разведения).

\* Животное F при значении 85,0 через 1 час считалось выбросом и было исключено из сводной статистики.

<sup>†</sup> Расчетные концентрации были < НПКО. Приведены экстраполированные значения.

Концентрации в плазме позволили получить начальные оценки T<sub>max</sub>, S<sub>max</sub>, периода полувыведения и AUC (табл. 3).

Таблица 3  
Фармакокинетика MRS4322 в плазме мышей после внутрибрюшинного введения

Группа	Матрица	Аналит	Доза (мг/кг)	Идентификатор животного	C <sub>max</sub>	T <sub>max</sub>	AUC <sub>last</sub>	AUC <sub>INF</sub>	Период полувыведения
					(нг/мл)	(ч)	(ч*нг/мл)	(ч*нг/мл)	
1	Плазма	MRS4322	0,16	ГО					
				A	40,2	0,083	24,2	24,4	0,306
				B	42,5	0,083	27,5	27,8	0,288
				C	65,8	0,083	37,6	38,2	0,337
				N	3	3	3	3	3
				Среднее	49,5	0,083	29,8	30,1	0,310
				СО	14,2	0,000	7,01	7,19	0,0247
CV%	28,6	0,0	23,5	23,8	8,0				

Примечание: Значения BLQ были преобразованы в ноль, были включены экстраполированные значения, и животное F через 1 час было исключено из анализа ФК.

Хотя концентрации в мозге были обнаруживаемыми, данных было недостаточно для оценки периода полураспада или других фармакокинетических параметров, кроме  $S_{max}$  и  $T_{max}$ . Однако, исходя из имеющихся данных, полученных для плазмы крови и мозга, было установлено, что отношение в мозгу/в плазме общего лекарственного средства составляло примерно 0,06 на основе средних концентраций  $S_{max}$  в плазме и мозге. Эти результаты подтверждают, что концентрации циркулирующего MRS4322 в плазме крови обнаруживаются после внутрибрюшинного введения мышам в условиях дозирования, используемых в моделях фототромбоза и черепно-мозговой травмы, и что MRS4322 распространяется в мозг в этих условиях дозирования.

Пример 2. Фармакокинетика MRS4322 после внутрибрюшинного введения MRS2365 мышам.

Цель.

Это исследование было разработано для определения концентраций MRS4322 в плазме крови и мозге после внутрибрюшинного введения агониста  $P2Y_1$ , MRS2365, в дозе, используемой в моделях фототромбоза и черепно-мозговой травмы мыши.

Способы.

Химические реактивы: MRS4322 был получен благодаря любезности доктора Кена Якобсона из Национального института диабета, болезней органов пищеварения и почек (National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, США). MRS2365 был получен от Tocris Biosciences (Бристоль, Великобритания). Толбутамид аналитического качества был получен из коммерческих поставок в Seventh Wave Laboratories (Maryland Heights, MO, США). Все другие химические вещества были получены от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, США).

Животные: В этом исследовании использовали самок мышей C57BL/6J весом примерно 0,02 кг, предоставленных Центром медицинских наук университета Техаса (University of Texas Health Sciences Center, San Antonio, TX, США). Все исследования проводились в соответствии с утвержденными Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию протоколами Центра медицинских наук университета Техаса.

Введение лекарственных средств: MRS2365 солибилизировали в физиологическом растворе с фосфатным буфером, а затем разбавляли физиологическим раствором с фосфатным буфером с получением дозировочного раствора. Конечная концентрация дозировочного раствора MRS2365 составляла 100 мкМ. 100 мкл дозировочного раствора вводили внутрибрюшинно каждой мышке на 20 г веса тела; MRS2365 вводили внутрибрюшинно в дозе 0,5 мкмоль/кг или 0,24 мг/кг. В каждый из моментов времени MRS2365 вводили трем мышам.

Отбор проб ткани: Образцы крови и головного мозга получали через 0, 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2 и 8 часов после введения дозы. В каждый из моментов времени отбора проб мышей подвергали эвтаназии в камере с окисью углерода (3 мыши на каждую временную точку). Забор цельной крови проводили путем пункции сердца в пробирки Microtainer, содержащие гепарин, образцы сразу же центрифугировали с получением плазмы; плазму хранили при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . В каждый из моментов времени образцы целого мозга были получены путем декапитации, затем мозг промывали в охлажденном льдом забуференном фосфатом физиологическом растворе и взвешивали. Затем образцы мозга немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Биоанализ: Предыдущие исследования показали, что после внутрибрюшинного или внутривенного введения не было циркулирующих концентраций MRS2365 и концентрации MRS2365 в мозге, поэтому данное исследование было сосредоточено только на обнаружении и количественном определении его метаболита MRS4322. Концентрации MRS4322 в плазме и в мозге определяли методом ЖХ-МС/МС с использованием толбутамида в качестве внутреннего стандарта. В следующей таблице приведены используемые условия ЖХ и МС/МС:



Биоаналитические методы определения концентрации MRS4322 в плазме и мозге

<b>Биоаналитические методы</b>			
<b>Системные компоненты</b>			
Модуль	Производитель	Модель	
ВЭЖХ	Shimadzu	Бинарные насосы Prominence LC-20AD	
Автопробоотборник	Leap	Prominence Sil-30AC	
Масс-спектрометр	AB Sciex	4000 Qtrap	
<b>Метод ВЭЖХ</b>			
Колонка	Phenomenex Kinetex C18 (2,1 x 50 мм, 2,6 мкм)		
Элюирование	Градиент, 0,4 мл/мин		
	Мобильная фаза А: 0,1% муравьиная кислота		
	Мобильная фаза В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле		
<b>Обнаружение и калибровка MRS4322 в плазме мыши по МС</b>			
Название пика: Толбутамид			
Использование в качестве внутреннего стандарта			
Q1/Q3 массы: 271,20/155,20 Да			
Название пика: MRS4322			
Внутренний стандарт: Толбутамид			
Q1/Q3 массы: 324,10/182,00 Да			
Подгонка	Линейн.	Взвешивание	1 / х
Точка пересечения	0,000704		
Наклон	0,00151		
Коэффициент корреляции	0,9998		
Область применения			
<b>Обнаружение и калибровка MRS4322 в плазме мыши по МС</b>			
Название пика: Толбутамид			
Использование в качестве внутреннего стандарта			
Q1/Q3 массы: 271,20/155,20 Да			
Название пика: MRS4322			
Внутренний стандарт: Толбутамид			
Q1/Q3 массы: 324,10/182,00 Да			
Подгонка	Линейн.	Взвешивание	1 / х
Точка пересечения	0,000209		
Наклон	0,000864		
Коэффициент корреляции	1,00		
Область применения			

Для каждого тканевого матрикса были созданы стандартные кривые и определены концентрации НПКО/ВПКО. Диапазон калибровки для стандартной кривой концентрации MRS4322 в плазме составлял 2,26-241 нг/мл. Диапазон калибровки для концентраций MRS4322 в мозге составлял 2,35-242 нг/мл.

Для биоанализа концентраций MRS4322 в головном мозге образцы мозга гомогенизировали в охлажденном льдом физиологическом растворе с фосфатным буфером в 4-кратном разведении. Аликвоты полученного разбавленного гомогената мозга обрабатывали ацетонитрилом и анализировали методом ЖХ-МС/МС. Из-за 4-кратного разбавления гомогената диапазон калибровки стандартной кривой для MRS4322 в мозге был переведен в 9,40-968 нг/г. В нескольких образцах MRS4322 был обнаруживаемым, значение было ниже НПКО для мозга, составляющего 9,40 нг/г, но было выше фона; в этих случаях конечная концентрация в мозге была получена экстраполированием по высоте пика МС.

Результаты.

После внутрибрюшинного введения мышам MRS2365 определяли концентрации MRS4322 в плазме и в образцах головного мозга (фиг. 2 и табл. 5).

Таблица 5

Концентрация MRS4322 в плазме и мозге мышей после внутрибрюшинного введения MRS2365

Группа	Матрица	Испытываемое соединение	Доза (мг/кг)	Время (ч)	Концентрация в плазме (нг/мл) по субъектам					
					A	B	C	Среднее	CO	N
1	Плазма	MRS4322	0,24 MRS2365	0	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				0,083	24,5	64,1	82,8	57,1	29,8	3
				0,25	46,5	43,2	47,4	45,7	2,20	3
				0,5	22,3	25,1	31,0	26,1	4,40	3
				1	2,30	4,02	3,53	3,28	0,890	3
				2	BLQ	1,02*	0,680*	0,850	NA	2
				8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
Группа	Матрица	Испытываемое соединение	Доза	Время (ч)	Концентрация в плазме (нг/г) по субъектам					
1	Мозг <sup>a</sup>	MRS4322	0,24 MRS2365	0	2,76*	10,0	4,61*	5,79	3,76	3
				0,083	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				0,25	3,92*	3,26*	4,16*	3,78	0,470	3
				0,5	3,19*	2,80*	2,70*	2,90	0,260	3
				1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0				
8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0				

BLQ = ниже предела количественного определения (2,26 нг/мл для плазмы; 9,40 нг/г для мозга из-за четырехкратного разведения).

\* Прогнозируемые значения; эти значения были ниже предела количественного определения.

<sup>a</sup> Представляется возможным, что при заборе образцов образцы 0 и 0,083 были помечены неправильно.

Концентрации в плазме позволили получить начальные оценки T<sub>max</sub>, C<sub>max</sub>, периода полувыведения и AUC (табл. 6).

Таблица 6

Фармакокинетика MRS4322 в плазме мышей после внутрибрюшинного введения MRS2365

Группа	Матрица	Аналит	Доза (мг/кг)	Идентификатор животного	C <sub>max</sub> (нг/мл)	T <sub>max</sub> (ч)	AUC <sub>last</sub> (ч*нг/мл)	AUC <sub>INF</sub> (ч*нг/мл)	Период полувыведения (ч)
1	Плазма	MRS4322	0,24 MRS2365	A <sup>a</sup>	46,5	0,25	21,7	22,3	0,17
				B	64,1	0,08	30,0	30,5	0,34
				C	82,8	0,08	34,8	35,1	0,28
				N	3	3	3	3	3
				Среднее	64,5	0,14	28,8	29,3	0,27
				CO	18,2	0,10	6,65	6,51	0,09
				CV%	28,2	69,5	23,1	22,2	33,1

Значения BLQ были преобразованы в ноль, в анализ ФК были включены экстраполированные значения.

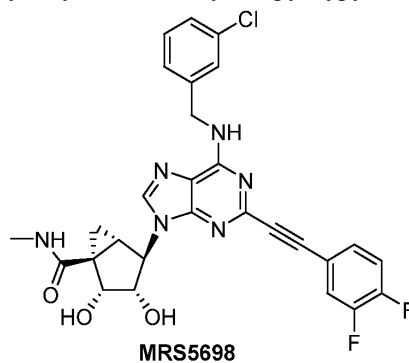
Хотя концентрации в мозге были обнаруживаемыми, данных было недостаточно для оценки периода полураспада или других фармакокинетических параметров, кроме C<sub>max</sub> и T<sub>max</sub>. Однако, исходя из имеющихся данных, полученных для плазмы крови и мозга, было установлено, что отношение в мозгу/в плазме общего лекарственного средства составляло примерно 0,10 на основе средних концентраций C<sub>max</sub> в плазме и мозге. Эти результаты подтверждают, что концентрации циркулирующего MRS4322 в плазме крови обнаруживаются после внутрибрюшинного введения агониста P2Y<sub>1</sub> MRS2365 мышам в условиях дозирования, используемых в моделях фототромбоза и черепно-мозговой травмы, и что MRS4322 распространяется в мозг в этих условиях дозирования. Концентрации MRS4322 в плазме и мозге были определены в двух различных исследованиях, после внутрибрюшинного введения самого MRS4322 (см. пример 1) и после внутрибрюшинного введения агониста P2Y<sub>1</sub> MRS2365. В обоих этих исследованиях MRS4322 или MRS2365 вводили в эквимолярных дозах 0,5 мкмоль/кг. При сравнении

результатов обоих исследований было обнаружено, что наблюдаемые концентрации MRS4322 в плазме были практически идентичны, а концентрации MRS4322 в головном мозге были очень похожи (сравните фиг. 1 и фиг. 2). Не было статистически значимой разницы в значениях периода полувыведения и AUC для MRS4322 после введения эквивалентных доз MRS4322 или MRS2365. Эти данные показывают, что после внутривенного введения мышам MRS2365 быстро и полностью метаболизируется до MRS4322, в результате чего фармакокинетика MRS4322 в плазме и мозге очень сходна с фармакокинетикой после внутривенного введения MRS4322 как такового.

Пример 3. Связывание MRS4322 в плазме и мозге мышей.

Цель.

Это исследование было разработано для определения свободной фракции MRS4322 в плазме крови и мозге и для их сравнения со свободными фракциями прототипного агониста аденозинового рецептора A<sub>3</sub> MRS5698. MRS5698 имеет следующую химическую структуру:



Способы.

Химические реактивы: MRS4322 был получен благодаря любезности доктора Кена Якобсона из Национального института диабета, болезней органов пищеварения и почек (National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, США). MRS5698 был получен от Tocris Biosciences (Бристоль, Великобритания). Сульфаметоксазол и варфарин аналитического качества были получены из коммерческих поставок в Seventh Wave Laboratories (Maryland Heights, MO, США). Все другие химические вещества были получены от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, США).

Подготовка животных и тканей: Плазму крови самцов мыши CD-1 получали из BioreclamationIVT (Westbury, NY, США) и хранили при температуре -80°C до использования. Мозг самцов мыши CD-1 также получали из BioreclamationIVT (Westbury, NY, США).

Пустые образцы ультрафильтрации плазмы готовили путем оттаивания замороженной плазмы, а затем предварительного нагревания плазмы в увлажненной камере с 5% CO<sub>2</sub> при температуре 37°C в течение 60 минут. Аликвоты по 800 мкл переносили в центробежный фильтр Centrifree (регенерированная целлюлоза Ultracel (NMWL 30000 а.е.м.), партия R5JA31736) и центрифугировали при 2900 об/мин при температуре 37°C в течение 10 минут; фильтрат плазмы и воды собирали и использовали для подготовки стандартов, пустых образцов и стандартов контроля качества.

Мозг взвешивали и гомогенизировали с 1:9 физиологическим раствором с фосфатным буфером, pH 7,4, при помощи гомогенизатора тканей Omni. Мозг от четырех мышей гомогенизировали, объединяли и смешивали с получением одного образца. Определение связывания плазмы: MRS4322, MRS5698, сульфаметаксазол и варфарин солибилизировали в ДМСО и затем разбавляли смесью ацетонитрил:вода 1:1 с получением 100 мкМ исходных диализных растворов. Сульфаметаксазол и варфарин использовали в качестве стандартов исследования с известными значениями связывания в плазме. Образцы плазмы предварительно нагревали в течение 60 минут в увлажненном инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>, в котором поддерживали температуру 37°C. В аликвоты по 3 мл предварительно нагретой плазмы добавляли MRS4322, MRS5698, сульфаметаксазол или варфарин, используя 100 мкМ исходные растворы каждого соединения с получением конечных концентраций 1 мкМ. Образцы плазмы с добавками определяемых соединений инкубировали в роторной мешалке в увлажненной камере с 5% CO<sub>2</sub> при температуре 37°C в течение минимум 60 минут. Через 60 минут три аликвоты по 800 мкл каждого образца добавляли в центробежный фильтр Centrifree и подвергали центрифугированию при 2900 об/мин в течение 10 минут при температуре 37°C. Три 100 мкл аликвоты остаточной плазмы собирали вместе с ультрафильтратом для биоанализа.

Определение связывания в мозге: MRS4322, MRS5698, сульфаметаксазол и варфарин солибилизировали в ДМСО и разбавляли смесью ацетонитрил:вода 1:1 с получением 100 мкМ исходных диализных растворов. Объединенные гомогенизированные образцы мозга предварительно нагревали в течение 60 минут в увлажненном инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>, в котором поддерживали температуру 37°C. В аликвоты по 3 мл гомогената головного мозга добавляли MRS4322, MRS5698, сульфаметаксазол или варфарин, используя 100 мкМ исходные растворы для каждого соединения с получением конечной концентрации 1 мкМ. Объединенные гомогенаты мозга с добавками определяемых соединений помещали на смесителе Nutator в увлажненный инкубатор с 5% CO<sub>2</sub> при температуре 37°C в течение 60 минут. Через 60 минут

три аликвоты по 800 мкл каждого образца добавляли в центробежный фильтр Centrifree и подвергали центрифугированию при 2900 об/мин в течение 10 минут при температуре 37°C. Аликвоты остаточного гомогената мозга и ультрафильтрата собирали для биоанализа.

Биоанализ.

Концентрации MRS4322 и MRS5698 в плазме и мозге в образцах плазмы, гомогенатах мозга и связанных ультрафильтратах с добавками определяемых соединений определяли методом ЖХ-МС/МС с использованием толбутамида в качестве внутреннего стандарта. Связанные концентрации сульфаметасазола и варфарина также определяли методом ЖХ-МС/МС с использованием стандартных условий (данные не показаны). В следующих таблицах приведены используемые условия ЖХ и МС/МС (табл. 7 и 8). Биоаналитические методы были идентичны для всех матриц; статистику стандартной кривой (например, подгонка, точка пересечения, наклон, коэффициент корреляции) определяли для каждой матрицы, но они существенно не отличались и, следовательно, не приведены для каждой матрицы.

Таблица 7

Биоаналитические методы для MRS4322 для определения концентраций в плазме, гомогенате мозга, ультрафильтрате плазмы и ультрафильтрате гомогената мозга

<b>Биоанализ образцов плазмы, гомогенатов мозга, ультрафильтратов плазмы и ультрафильтратов гомогената мозга</b>			
<b>Системные компоненты</b>			
Модуль	Производитель	Модель	
ВЭЖХ	Shimadzu	Бинарные насосы Prominence LC20AD	
Автопроботборник	CTC Leap	HTC PAL	
Масс-спектрометр	AB Sciex	API 4000	
<b>Метод ВЭЖХ</b>			
Колонка	Phenomenex Kinetex C18 (2,1 x 50 мм, 2,6 мкм)		
Элюирование	Градиент, 0,4 мл/мин		
	Мобильная фаза А: 0,1% муравьиная кислота в воде		
	Мобильная фаза В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле		
<b>Условия масс-спектрометрии для MRS4322</b>			
Название пика: MRS4322			
Q1/Q3 массы: 324,10/182,00	Да		
Название пика: Толбутамид			
Q1/Q3 массы: 271,20/155,20	Да		
Подгонка	Линейн.	Взвешивание	1 / x
Точка пересечения	0,0181		
Наклон	0,00192		
Коэффициент корреляции	0,9988		

Таблица 8

Биоаналитические методы для определения концентраций MRS5698 в плазме, гомогенате мозга, ультрафильтрате плазмы и ультрафильтрате гомогената мозга

<b>Системные компоненты</b>			
Модуль	Производитель	Модель	
ВЭЖХ	Shimadzu	Бинарные насосы Prominence LC20AD	
Автопроботборник	CTC Leap	HTC PAL	
Масс-спектрометр	AB Sciex	API 4000	
<b>Метод ВЭЖХ</b>			
Колонка	Phenomenex Kinetex C18 (2,1 x 50 мм, 2,6 мкм)		
Элюирование	Градиент, 0,4 мл/мин		

	Мобильная фаза А: 0,1% муравьиная кислота в воде		
	Мобильная фаза В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле		
<b>Условия масс-спектрометрии для MRS5698</b>			
Название пика: MRS5698			
Q1/Q3 массы: 565,10/395,90 Да			
Название пика: Толбутамид			
Q1/Q3 массы: 271,20/155,20 Да			
Подгонка	Линейн.	Взвешивание	1 / x
Точка пересечения	0,107		
Наклон	0,00786		
Коэффициент корреляции	0,9986		

Для каждого тканевого матрикса были созданы стандартные кривые и определены концентрации НПКО/ВПКО. Диапазон калибровки для стандартных кривых концентрации MRS4322 и MRS5698 в плазме составлял 400-1200 нМ. Диапазон калибровки для стандартных кривых ультрафильтратов плазмы для MRS4322 и MRS5698 составлял 100-1200 нМ. Диапазоны калибровки для стандартных кривых гомогената мозга и ультрафильтрата гомогената мозга для MRS4322 составляют 400-1200 нМ и 100-1200 нМ, соответственно. Диапазоны калибровки для стандартных кривых гомогената мозга и ультрафильтрата гомогената мозга для MRS5698 составляют 400-1200 нМ и 1-500 нМ, соответственно.

Результаты.

Связывание с плазмой и свободную фракцию определяли для MRS4322 и MRS5698 с использованием ультрафильтрации плазмы. Связывание с плазмой составляло 25,8% для MRS4322; соответствующая свободная фракция составляла 0,742 (табл. 9). Концентрации MRS5698 не были обнаружены в ультрафильтрате плазмы; MRS5698 был полностью извлечен в остаточных образцах плазмы с добавкой определяемого соединения, полученных с донорской стороны устройств Centrifree (данные не показаны). Это указывает на то, что низкие концентрации MRS5698 в ультрафильтрате не были связаны с низким аналитическим извлечением соединения. В целом, эти данные согласуются с высоким связыванием MRS5698 с белком (99,88%) в плазме и тканях мышцы, о чем сообщалось в литературе (Tosh, DK et al. Purinergic Signalling (2015) 11: 371-387). Связывание стандартов исследования сульфаметаказола и варфарина соответствовало литературным значениям.

Таблица 9

Несвязанная фракция и связывание MRS4322 и MRS5698 в плазме мышцы

Субстрат	Несвязанная фракция		% связывания		N
	Среднее	СО	Среднее	СО	
MRS4322	0,742	0,065	25,8	6,5	3
MRS5698	*	*	*	*	3
Сульфаметаказол	0,345	0,027	65,5	2,7	3
Варфарин	0,0485	0,0031	95,1	0,3	3

\* Концентрации MRS5698 в ультрафильтрате плазмы были BLQ (ниже предела количественного определения).

Связывание в мозге и свободную фракцию определяли для MRS4322 и MRS5698 с использованием ультрафильтрации гомогенатов мозга. Связывание в мозге составляло 87% для MRS4322; соответствующая свободная фракция составляла 0,13 (табл. 10). Концентрации MRS5698 в ультрафильтрате гомогената мозга обнаружены не были. Для целей оценки использовали НПКО для MRS5698 в ультрафильтрате гомогената мозга для расчета величины связывания в мозге. Итоговое значение связывания в мозге составило 99,99%. В целом, эти данные согласуются с высоким связыванием MRS5698 с белком (99,88%) в плазме и тканях мышцы, о чем сообщалось в литературе (Tosh, DK et al. Purinergic Signalling (2015) 11:371-387). Связывание стандартов исследования сульфаметаказола и варфарина соответствовало литературным значениям.

Таблица 10

Несвязанная фракция и связывание MRS4322 и MRS5698 в гомогенатах мозга мышцы

Анализ	Субстрат	Несвязанная фракция		% связывания		N
		Среднее	СО	Среднее	СО	
1	MRS4322	0,130	0,010	87,0	1,0	3
	MRS5698	<0,000122*	---	>99,99*	---	3
	Сульфаметаказол	0,431	0,049	56,9	4,9	3
	Варфарин	0,208	0,038	79,2	3,8	3

\* MRS5698 не был обнаружен в ультрафильтрате; для оценки величины связывания использовали НПКО для анализа.

В целом эти данные показывают, что MRS4322 имеет значительно более высокую свободную фракцию и более низкое связывание с белком, чем агонист аденозинового рецептора A<sub>3</sub> MRS5698 в плазме и

в мозге. Эти данные указывают на то, что для данной общей концентрации в плазме или мозге для взаимодействия с эффекторными участками будут доступны значительно более высокие концентрации MRS4322, чем было бы доступно для MRS5698.

Пример 4. Стабильность и метаболизм *in vitro* MRS2365 в крови и плазме мыши и человека.

Цель.

Это исследование было разработано для определения стабильности *in vitro* и метаболической судьбы агониста P2Y<sub>1</sub> MRS2365 в крови и плазме мыши и человека.

Способы.

Химические реактивы: MRS2365 был получен от Tocris Biosciences (Бристоль, Великобритания). MRS4322 был получен благодаря любезности доктора Кена Якобсона из Национального института диабета, болезней органов пищеварения и почек (National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, США). Все другие химические вещества были получены от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, США). Эналаприл и прокаин использовали в качестве стандартов стабильности плазмы и крови для мыши и человека, соответственно.

Подготовка тканей: Плазму крови самцов мыши CD-1 и плазму крови людей получали из BioreclamationIVT (Вестбери, Нью Йорк, США) и хранили при температуре -80°C до использования. Цельная кровь была получена от самцов мышей CD-1 и людей-добровольцев в лаборатории Seventh Wave Laboratories (Мэриленд Хайтс, Миссури, США). Образцы плазмы и крови готовили, используя в качестве антикоагулянтов ЭДТА (1 мМ) или гепарин лития.

Определение стабильности в плазме: MRS2365, эналаприл и прокаин растворяли в физиологическом растворе с фосфатным буфером, pH 7,4. Образцы плазмы (приготовленные из крови с ЭДТА или гепарином лития в качестве антикоагулянта) предварительно нагревали в течение 60 минут в увлажненном инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>, в котором поддерживали температуру 37°C. Инкубацию для оценки стабильности инициировали добавлением MRS2365 (конечная концентрация 1 мкМ). Для первоначальных оценок стабильности в плазме с ЭДТА использовали время инкубации 0, 10, 30, 60, 120 и 240 минут (фиг. 3 и фиг. 4). В последующих исследованиях, в которых сравнивали плазму с ЭДТА и плазму с гепарином, использовали время инкубации 0, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 и 30 минут (фиг. 7). Дополнительную инкубацию для определения стабильности в плазме для сравнения плазмы с ЭДТА и плазмы с гепарином, проводили с использованием периодов времени 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60 и 90 секунд (фиг. 8). Для анализа метаболитов MRS2365 инкубировали в гепаринизированной плазме крови человека в концентрации 100 мкМ в течение 10 или 30 минут (фиг. 9). Во всех исследованиях плазму немедленно помещали в пробирки для микротейнера, замораживали на сухом льду и хранили при температуре -80°C до анализа.

Определение стабильности в крови: MRS2365, эналаприл и прокаин растворяли в физиологическом растворе с фосфатным буфером, pH 7,4. Образцы крови (обработанные ЭДТА или гепарином лития) предварительно нагревали в течение 60 минут в увлажненном инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>, в котором поддерживали температуру 37°C. Инкубацию для оценки стабильности инициировали добавлением MRS2365 (конечная концентрация 1 мкМ) (фиг. 5 и фиг. 6). Аликвоты образца крови получали через 0, 1, 2,5, 7,5, 10 и 30 минут и помещали в пробирки для микротейнера. Для анализа метаболитов MRS2365 инкубировали в гепаринизированной плазме крови человека в концентрации 100 мкМ в течение 10 или 30 минут (фиг. 10). Во всех исследованиях плазму немедленно готовили центрифугированием при температуре 4°C, помещали в пробирки для микротейнера, замораживали на сухом льду и хранили при температуре -80°C до анализа.

Биоанализ.

Концентрации MRS2365 в плазме и в крови определяли методом ЖХ-МС/МС с использованием толбутамида в качестве внутреннего стандарта. В следующей таблице приведены используемые условия ЖХ и МС/МС (табл. 11). Биоаналитические методы были идентичны для всех матриц; статистику стандартной кривой (например, Fit, Intercept, Slope, Correlation Coe factor) определяли для каждой матрицы, но они существенно не отличались и, следовательно, не приведены для каждой матрицы.

Биоаналитические методы для MRS2365 для определения концентрации в плазме и крови при определении стабильности *in vitro*

Методы биоанализа - плазма и кровь		
Системные компоненты		
Модуль ВЭЖХ	Производитель Shimadzu	Модель Prominence
Автопроботборник	Leap	СТС Pal
Масс-спектрометр	AB Sciex	API 4000
Метод ВЭЖХ		
Колонка	Luna C18 (2,1 x 50 мм, 2,6 мкм)	
Элюирование	Градиент, 0,4 мл/мин Мобильная фаза А: 2 мМ ацетат аммония, рН 7,65 Мобильная фаза В: 2 мМ ацетат аммония в ацетонитриле	
Обнаружение и калибровка MRS2365 в плазме крови и в крови по МС		
Название пика: Толбутамид Использование в качестве внутреннего стандарта Q1/Q3 массы: 269,00/170,00 Да		
Название пика: MRS2365 Внутренний стандарт: Толбутамид Q1/Q3 массы: 482,11/384,00 Да		
Подгонка	Линейн.	Взвешивание 1 / (x * x)
Точка пересечения	0,00004	
Наклон	0,00002	
Коэффициент корреляции	0,9854	
Область применения		

Для каждого тканевого матрикса были созданы стандартные кривые и определены концентрации НПКО/ВПКО. Диапазон калибровки для стандартной кривой концентрации MRS2365 в плазме и крови составлял 5-5000 нг/мл. Образцы для контроля качества использовали в концентрациях 32, 160, 800 и 4000 нг/мл.

Образцы плазмы и крови были также качественно проанализированы на наличие метаболитов MRS2365 с использованием протокола "обнаружение метаболитов" ("metabolite scouting") на основе ЖХ-МС/МС. Из анализа метаболических путей других нуклеотидов (например, АТФ, АДФ) было выдвинуто предположение, что наиболее вероятными метаболитами MRS2365 будут дефосфорилированный (т.е. монофосфатный) метаболит (MRS2347, молекулярная масса 403,07) и/или полностью дефосфорилированный рибозидный метаболит (MRS4322, молекулярная масса 323,10). Образцы крови и плазмы анализировали на исходное соединение и метаболиты с помощью ЖХ/МС-МС с регистрацией положительных и отрицательных ионов, поскольку предполагалось, что фосфорилированные соединения будут преимущественно генерировать отрицательные ионы, в то время как рибозид MRS4322 будет преимущественно генерировать положительные ионы. В режиме регистрации положительных ионов хроматограммы экстракционной ионной хроматографии контролировали массы в диапазоне 323,7-324,7 и 403,7-404,7 для обнаружения MRS4322 и MRS2347, соответственно. Любые пики ионов в этих диапазонах были дополнительно проанализированы с получением спектров ионов продуктов для этих пиков на хроматограмме, полученной ионной хроматографией. В режиме регистрации отрицательных ионов хроматограммы экстракционной ионной хроматографии контролировали массы в диапазоне 321,70-322,70, 401,70-402,70 и 481,70-482,70 для обнаружения MRS4322, MRS2347 и MRS2365, соответственно; пики были дополнительно проанализированы с получением спектров ионов продуктов. Поскольку подлинные стандарты MRS4322 и MRS2347 были недоступны, была возможна только качественная идентификация метаболитов, поскольку нельзя было сравнить высоты/площади пиков ионов из-за потенциальных различий в эффективности ионизации.

Результаты.

Для оценки стабильности MRS2365 в плазме мыши и человека использовались два протокола периода действия. Предварительные данные были получены для плазмы, приготовленной с ЭДТА, в течение 240 минут. В последующем исследовании использовали периоды времени от 1 до 30 минут после инкубации, а в последнем исследовании использовали более короткий период времени - 5-90 секунд после инкубации. Во всех протоколах стабильность плазмы анализировали в плазме, приготовленной из крови, содержащей ЭДТА или гепарин лития в качестве антикоагулянта. Данные стабильности *in vitro* для эналаприла (для мыши) и прокаина (для человека) в плазме и цельной крови соответствовали опубликованным значениям (данные не представлены). В исследованиях стабильности плазмы с использованием плазмы, приготовленной с помощью EDTA, MRS2365 был по существу стабильным в течение всего

периода инкубации до 240 минут после инкубации (фиг. 3 и фиг. 4). Значения периода полувыведения не могли быть рассчитаны в течение времени инкубации, и, таким образом, составляли > 240 минут. В последующих анализах метаболитов не было обнаружено ни MRS2347, ни MRS4322. Эти данные подтверждают, что MRS2365 был стабильным *in vitro* в плазме крови мыши и человека.

Аналогичные наблюдения были сделаны, когда стабильность MRS2365 была оценена в цельной крови мыши и человека, обработанных ЭДТА в качестве антикоагулянта (фиг. 5 и фиг. 6). В этих исследованиях период полувыведения MRS2365 в цельной крови мышей, обработанной ЭДТА, составлял 47 минут, что свидетельствует о том, что ЭДТА не полностью ингибирует клиренс MRS2365 в этой матрице. Однако MRS2365 снова оказался полностью стабильным в цельной крови человека, обработанной ЭДТА, с предполагаемым периодом полувыведения > 240 минут. В этих исследованиях цельной крови метаболиты не были обнаружены.

Эти данные не согласуются с исходной оценкой фармакокинетических параметров MRS2365 у мышей *in vivo* с гепарином в качестве антикоагулянта крови для получения плазмы, где MRS2365 быстро выводился при скорости, приближающейся к сердечному выбросу, из чего можно предположить большой внепеченочный клиренс соединения. Известно, что ЭДТА хелатирует двухвалентные катионы, необходимые для ферментативной активности эктонуклеотидаз, ферментов, ответственных за дефосфорилирование нуклеотидов, которые как присутствуют на поверхности клеточных мембран, так и циркулируют в крови и плазме (см. Ziganshin et al. *Pflugers Arch.* (1995) 429:412-418). Таким образом, вполне возможно, что основной метаболический путь агониста P2Y<sub>1</sub> нуклеотидного аналога MRS2365 полностью ингибируется ЭДТА, используемой для получения плазмы и цельной крови для исследований, как описано выше. Чтобы исследовать эту возможность, были проведены дополнительные исследования стабильности, в которых проводили сравнение стабильности MRS2365 в плазме, полученной с ЭДТА или гепарином лития, причем последний представляет собой такой антикоагулянт, для которого нет сообщений о ингибирующих эффектах на эктонуклеотидазы. Сначала были проведены исследования с гепаринизированной плазмой и цельной кровью в течение 0-30 минут. Количественное определение концентраций MRS2365 выявило чрезвычайно низкие концентрации MRS2365 во все моменты времени, при этом данных было недостаточно для расчета периода полувыведения *in vitro* (данные не показаны). Поскольку низкие/необнаружимые концентрации MRS2365 наблюдались даже в самые короткие моменты времени в этом исследовании (0 и 1 минута), исследование было проведено повторно со значительно более короткими периодами времени (0-90 секунд) для того, чтобы сравнить стабильность *in vitro* в плазме с ЭДТА и с гепарином и попытаться рассчитать период полувыведения *in vitro*. В этом более коротком исследовании MRS2365 был относительно стабильным в плазме мыши и человека, полученной с ЭДТА (фиг. 5 и фиг. 6); изменчивость в концентрациях MRS2365, вероятно, была вызвана неполным перемешиванием в начале короткого промежутка времени и изменчивостью в выборке нескольких временных точек в течение 90-секундного инкубационного периода. Однако в плазме, обработанной гепарином, концентрации MRS2365 были чрезвычайно низкими даже в самые короткие (0 и 5 секунд) промежутки времени. MRS2365 был полностью стабильным при инкубации в физиологическом растворе с фосфатным буфером. Вместе эти данные позволяют предположить, что хотя MRS2365 по своей природе является стабильным в растворе, он быстро разлагается в плазме и крови мыши и человека в результате процесса, который ингибируется ЭДТА. Учитывая, что MRS2365 является нуклеотидным аналогом, а ЭДТА является известным ингибитором эктонуклеотидаз, дефосфорилирующих нуклеотиды, эти данные убедительно свидетельствуют о том, что MRS2365 подвержен быстрому дефосфорилированию в плазме и цельной крови, что согласуется с фармакокинетическими данными *in vivo*, полученными для MRS2365 у мышей.

Для дальнейшего изучения возможности того, что дефосфорилирование MRS2365 является причиной нестабильности в плазме и цельной крови мыши и человека было проведено обнаружение метаболитов в гепаринизированной плазме и крови человека после инкубации MRS2365 при 100 мкМ в течение 10 или 30 минут; использовали более высокую концентрацию субстрата для обеспечения обнаружения любых образовавшихся метаболитов. Представлены типичные хроматограммы ионов и спектры ионов продуктов в условиях положительной ионизации (фиг. 7 и фиг. 8); хроматограммы с отрицательной ионизацией и спектры ионов продуктов показали аналогичные результаты (данные не показаны). Хотя отсутствие химических стандартов не позволило определить абсолютные концентрации метаболитов, относительное содержание метаболита M1 увеличилось по сравнению с метаболитом M2 через 10-30 минут после инкубации. Хроматограммы исходных ионов метаболитов M2 и M1 и спектры ионов полученного в результате продукта в обоих условиях ионизации соответствовали массе и структуре дефосфорилированного монофосфатного метаболита MRS2347 и полностью дефосфорилированного рибозидного метаболита MRS4322, соответственно (фиг. 9). Обнаружение обоих метаболитов и увеличение содержания метаболита M1 (MRS4322) по отношению к метаболиту M2 (MRS2347) позволили предположить поэтапное дефосфорилирование MRS2365 в плазме и крови человека, когда монофосфорилированное промежуточное соединение MRS2347 затем дополнительно дефосфорилируется до нефосфорилированного рибозида MRS4322.

Вместе эти данные подтверждают гипотезу о том, что MRS2365 быстро метаболизируется в плазме



и крови за счет циркуляции эктонуклеотидаз, которые дефосфорилируют исходное соединение, что в конечном итоге приводит к нефосфорилированному рибозиду MRS4322. Этот процесс ингибируется ЭДТА, агентом, который, как известно, хелатирует двухвалентные катионы, необходимые для активности эктонуклеотидазы.

Пример 5. Нейропротективная эффективность MRS4322 после ЧМТ у мышей.

Цель.

Это исследование было разработано для определения нейропротективной эффективности MRS4322 у мышей, подвергшихся черепно-мозговой травме (ЧМТ), и для того, чтобы провести сравнение с мышами, получавшими MRS2365 и полный агонист аденозинового рецептора A<sub>3</sub>, CI-IB-MECA.

Способы.

Химические реактивы: MRS4322 был получен благодаря любезности доктора Кена Якобсона из Национального института диабета, болезней органов пищеварения и почек (National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, США). CI-IB-MECA коммерчески доступен от Tocris Biosciences (Бристоль, Великобритания) и нескольких других поставщиков. Все другие химические вещества были получены от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, США).

Животные и черепно-мозговые травмы (ЧМТ): ЧМТ выполняли с применением модели контролируемого закрытого повреждения черепа, как описано в Talley-Watts et al. 2012 (J. Neurotrauma 30, 55-66). Следуя описанному в приведенной публикации способу, с помощью пневматического ударного устройства создавали умеренную ЧМТ, при которой черепа и твердая мозговая оболочка не повреждались. Для этого мышей C57BL/6 анестезировали изофлураном (3% индукция, 1% поддержания) в 100% кислороде. Поддерживали температуру тела 37°C с помощью обогреваемого хирургического стола с регулируемой температурой. На коже головы выполняли небольшой разрез по средней линии с использованием асептических хирургических методов. На череп помещали 5 мм диск из нержавеющей стали и фиксировали с помощью суперклея на правой теменной кости между брегмой и лямбдой над соматосенсорной корой.

Затем мышью помещали на площадку непосредственно под пневматическим ударным наконечником. Наносили откалиброванный удар со скоростью 4,5 м/с на глубине 2 мм, что вызывало у мыши умеренную травму. На надрезы на коже головы накладывали нейлоновый плетёный материал 4-0, и на разрез наносили мазь с антибиотиком. Мышей помещали в термоблок интенсивной терапии (Braintree Scientific, модель FV-1; 37°C; 27% O<sub>2</sub>) и наблюдали до полного пробуждения животного и начала свободного движения. Через тридцать минут после травмы или симуляции (без травмы) мышам вводили носитель (физиологический раствор) или лекарственные средства (MRS4322, CI-IB-MECA или MRS2365). Дозы MRS4322, CI-IB-MECA и MRS2365 составляли 0,16, 0,24 и 0,2 мг/кг, соответственно, каждая эквивалентна эквимольным дозам примерно 0,5 мкмоль/кг. Вестерн-блоттинг для GFAP: В определенные моменты времени мышью анестезировали изофлураном и умерщвляли. Мозг извлекали и помещали на лед для рассечения в пораженных и неизмененных полушариях мозга. Выделенную ткань быстро гомогенизировали в охлажденном гомогенизирующем буфере (0,32 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 1 М Трис-HCL, pH = 7,8) на льду, используя стеклянный гомогенизатор Даунса Wheaton (20 оборотов). Гомогенат переносили в пробирку объемом 2 мл и центрифугировали при 1000 г в течение 10 минут при температуре 4°C и супернатант собирали и анализировали. Концентрацию белка определяли методом с бицинониновой кислотой с использованием разведения 1:50. 100 мкг белка удаляли в виде аликвот для каждого образца, добавляли буфер Лэммли, содержащий β-меркаптоэтанол и образец помещали в тепловой блок на 3 минуты при температуре 95°C. Образцы загружали в 12% гель и обрабатывали при 80 В в течение 20 минут, а затем в течение 40 минут при 130 В. Образцы переносили на нитроцеллюлозную мембрану при 100 В на 1 час. Мембрану блокировали 5% молоком в TBS-T в течение 30 минут. Добавляли GFAP (1:1000-Imgenex IMG-5083-A) и оставляли на ночь при температуре 4°C. Мембрану трижды промывали TBS-T в течение 10 минут. Вторичное антитело для GFAP (конъюгированное с ослиной анти-кроличьей HRP (ImmunoJackson Laboratories; 711-035-152; 1: 20000) применяли при комнатной температуре в течение 1 часа. Мембраны промывали TBS-T в течение 15 минут (3 раза) и проявляли с использованием набора Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer, Inc.), следуя указаниям производителя.

Результаты.

MRS4322 снижает экспрессию GFAP в мозге мыши после ЧМТ. Экспрессия глиофибрилярного кислого белка (GFAP) была использована в качестве биомаркера для реактивного глиоза после ЧМТ (Talley-Watts et al. 2012; Sofroniew, 2005). Выполняли вестерн-блоттинг для экспрессии GFAP у мышей после симуляции, ЧМТ или ЧМТ с лечением (MRS4322 или MRS2365), умерщвленных через 7 дней после нанесения травмы. Во-первых, данные вестерн-блоттинга подтвердили, что ЧМТ вызывала значительное увеличение экспрессии GFAP как на ипсилатеральной (где и было сосредоточено воздействие), так и на контралатеральной стороне головного мозга через 7 дней после травмы (фиг. 12А). Экспрессия GFAP была значительно ниже в блотах мышью, получавших MRS4322 или MRS2365 в виде инъекции в течение 30 минут после первоначального повреждения (фиг. 12А). Для контроля нагрузки использовали бета-актиновые вестерн-блоты, приведенные под соответствующими дорожками. Вестерн-блоты, показанные на фиг. 12А, все были получены в репрезентативном эксперименте и для них использовали один и тот же гель. Данные, усредненные по 3 отдельным экспериментам и показывающие относительные изменения в

соотношениях GFAP/актин (интенсивности полос, измеренные в программном обеспечении Image J), представлены в виде среднего  $\pm$  SEM на фиг. 12B. Значения были нормализованы к уровням ЧМТ на 7-й день (100%) для консолидации данных. Общее количество мышей для данного экспериментального лечения обозначено на фиг. 12B как N.

MRS4322 и агонист аденозинового рецептора  $A_3$  снижают экспрессию GFAP в плазме мыши после ЧМТ. Уровни GFAP в плазме также использовали в качестве биомаркера для ЧМТ из-за разрушения гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) после травмы. Следовательно, также отбирали образцы плазмы на 7 день у мышей с ЧМТ. Было обнаружено, что, как и для ткани мозга, уровни GFAP были легко обнаружены на 7-й день с помощью вестерн-блоттинга (фиг. 12C). Что еще более важно, было обнаружено, что вестерн-блоттинг плазмы крови мышей с ЧМТ, получавших MRS4322 или CI-IB-МЕСА (агонист аденозинового рецептора  $A_3$ ), показал значительно сниженные уровни GFAP по сравнению с актином (фиг. 12C). Гистограммы средних соотношений GFAP/актин для каждого экспериментального условия представлены на фиг. 12D. Общее количество мышей на эксперимент указано как значение N.

MRS4322 является агонистом с низким сродством (4900 нМ) рецептора  $A_3$  у мыши. И наоборот, CI-IB-МЕСА является агонистом с высоким сродством (0,18 нМ) у мыши - сродство этих двух соединений отличается примерно в 25000 раз. Однако в модели фототромботического инсульта мыши и модели ЧМТ MRS4322 демонстрирует значительную эффективность, которая блокируется антагонистом  $A_3$  MRS1523, тогда как CI-IB-МЕСА неактивен (в случае инсульта) или слабо активен (ЧМТ, фиг. 12). С точки зрения аффинности рецепторов это неочевидный результат. Наше текущее объяснение для этого факта основано на наших собственных данных всасывания, распределения, метаболизма и выведения/фармакокинетики, полученных для MRS4322 и CI-IB-МЕСА. CI-IB-МЕСА представляет собой липофильное соединение (сLogP примерно 2,5) с высокой степенью связывания с белками плазмы крови (свободная фракция 0,002) и с высокой степенью неспецифического связывания с тканями головного мозга (свободная фракция 0,002). MRS4322 представляет собой очень гидрофильное соединение (сLogP < 0), которое имеет очень большую несвязанную фракцию в плазме (0,74) и мозге (0,13). Только несвязанное лекарственное средство доступно для распространения через мембраны и взаимодействия с рецепторами. Таким образом, несмотря на более низкое сродство к рецептору, фракция MRS4322, доступная для взаимодействия с рецептором  $A_3$  в этих моделях на мышах, по меньшей мере в 1000 раз выше, чем у CI-IB-МЕСА. Авторы настоящего изобретения полагают, что эти существенные различия в физико-химических свойствах соединений и характеристиках всасывания, распределения, метаболизма и выведения/фармакокинетики способствуют неочевидной эффективности MRS4322 по сравнению с CI-IB-МЕСА (и MRS5698, другим липофильным агонистом  $A_3R$  с высокой степенью связывания/с высоким сродством) в этих моделях на мышах.

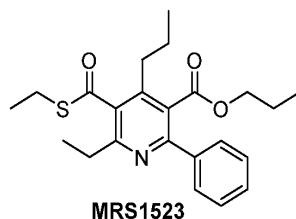
Агонизм смещенной активности Аденозиновый рецептор  $A_3$  представляет собой сопряженный с G-белком плейотропный рецептор, т.е. агонизм этого рецептора потенциально активирует множественные нижестоящие пути через множество G-белков, а также бета-аррестин. Пути, которые активируются при агонизме рецептора  $A_3$ , в настоящее время идентифицированы, но не ограничиваются ими: Gq11-опосредованная внутриклеточная мобилизация кальция, Gi-опосредованная модуляция продукции цАМФ и Gi-опосредованное фосфорилирование ERK1/2 и Akt. Одним из обнаруженных авторами настоящего изобретения аспектов является опосредованная  $A_3$  мобилизация внутриклеточного кальция, приводящая к стимуляции продукции митохондриальной АТФ в астроцитах.

Агонизм смещенной активности представляет собой новую концепцию в рецепторной фармакологии. Эта концепция гласит, что для плейотропных рецепторов фактически существуют разные классы агонистов, некоторые из них могут активировать все нижестоящие пути, в то время как другие демонстрируют предвзятость в активации поднабора нижестоящих путей. В изысканиях новых лекарственных средств и рецепторной фармакологии агонизм смещенной активности вводит возможность повышенной специфичности в активации пути с меньшим количеством нежелательных эффектов, то есть с меньшим количеством побочных эффектов. Существуют данные в пользу агонизма рецептора  $A_3$  смещенной активности. Однако прототипные агонисты с высоким сродством, такие как CI-IB-МЕСА и MRS5698, являются полными агонистами, которые не демонстрируют активацию смещенной активности вышеупомянутых нижестоящих путей. Соответственно, не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, полагают, что MRS4322 представляет собой агонист смещенной активности, который преимущественно активирует внутриклеточную мобилизацию кальция с меньшей активацией/без активации других  $A_3$ -опосредованных путей. Этот результат объясняет эффективность MRS4322, наблюдаемую в модели инсульта и ЧМТ на мышах, относительно полных агонистов/агонистов без смещенной активности CI-IB-МЕСА и MRS5698.

Пример 6. Нейропротективная эффективность MRS4322 после инсульта у мышей.

Цель.

Это исследование было разработано для определения нейропротективной эффективности MRS4322 у мышей, подвергнутых инсульту, и проведения сравнения мышей, получавших MRS2365 с антагонистом рецептора  $A_3$  MRS1523 и без него, и в сравнении с полными агонистами  $A_3R$  MRS5698 и CI-IB-МЕСА. MRS1523 имеет следующую структуру:



#### Способы.

Химические реактивы: MRS4322 был получен благодаря любезности доктора Кена Якобсона из Национального института диабета, болезней органов пищеварения и почек (National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, США). CI-IB-MECA, MRS5698 и MRS2365 коммерчески доступны от Tocris Biosciences (Бристоль, Великобритания) и нескольких других поставщиков. Все другие химические вещества были получены от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, США).

Инсульт, вызванный фототромбозом: Фототромбоз выполняли так, как описано в Zheng et al 2010 (PloS One 5 (12): e14401). Вкратце, бенгальский розовый краситель - это флуоресцентный краситель, который при инъекции в сосудистую сеть и возбуждении генерирует синглетный кислород, который повреждает эндотелиальную стенку и вызывает локальный тромбоз (сгусток). Используя эту технику, мышам в хвостовую вену делали инъекцию 0,1 мл стерилизованного бенгальского розового красителя (RB, Sigma, США) в искусственной спинномозговой жидкости (aCSF). Концентрация RB составляла 20 мг/мл. Кортикальная область была отцентрирована в поле формирования изображения и освещена зеленым лазером (543 нм, 5 мВт) с использованием 40-кратного иммерсионного объектива 0,8-NA (Nikon, Токио). Образование сгустка контролировали в режиме реального времени до тех пор, пока целевой сосуд или нижележащие капилляры не были плотно закупорены. Стабильные сгустки были впоследствии идентифицированы с помощью нефлуоресцентной сегментации сосудов, заканчивающихся высокофлуоресцентными областями. В контрольных экспериментах лазерное освещение или бенгальский розовый сам по себе не приводили к образованию сгустка. MRS4322 (0,16 мг/кг; 0,5 мкмоль/кг) или MRS2365 (0,24 мг/кг; 0,5 мкмоль/кг) вводили путем внутрибрюшинных инъекций (в/б). Мышам вводили антагонист рецептора A<sub>3</sub> MRS1523 в виде внутрибрюшинных инъекций (2 мг/кг) в моменты времени 0 и 2 часа, чтобы обеспечить антагонизм рецептора на протяжении всего исследования.

Животные и инсульт, вызванный фототромбозом: Инсульт вызывали так, как описано в Zheng et al 2010 (PloS One 5 (12): e14401). В этом исследовании использовали самок мышей C57B1/6 (4-6 месяцев). Из методов этого документа: Мышей анестезировали 3%-ным изофлураном со 100%-ным кислородом и затем поддерживали 1%-ным изофлураном через дыхательный контур. Глубину анестезии контролировали и регулировали в соответствии с показателями жизнедеятельности, реакцией на щипок и морганием глаз. Температуру тела поддерживали на уровне 37°C с помощью электрогрелки, управляемой обратной связью (Gaymar T/Pump). Жизненно важные показатели, включая насыщение кислородом, частоту дыхания и частоту сердечных сокращений, постоянно контролировали с помощью системы MouseOx (STARR Life Sciences). Шерсть на голове мышей выстригали, на голове делали небольшой разрез, обнажающий череп. Изготовленную на заказ пластину из нержавеющей стали приклеивали к черепу с помощью Vet-Bond Tissue Adhesive (3M, Сент-Пол, Миннесота, США). Над правой первичной соматосенсорной корой было создано окно визуализации - участок истонченного черепа (~1,5 мм назад от брегмы и 2 мм вбок от средней линии) в зависимости от эксперимента. Вкратце, большую область черепа сначала истончали при помощи электрической дрели, а затем дополнительно истончали хирургическим лезвием. Конечная толщина истонченного черепа составляла примерно 50 мкм. После создания окна визуализации в черепе мыши переходили на стадию микроскопии и использовались для фототромбоза или экспериментов по визуализации. Для повторных экспериментов по визуализации пластину осторожно отделяли от черепа и зашивали кожу головы (шелковая нить Ethicon 6-0). После каждого эксперимента мышей возвращали в клетку до следующего момента времени или умерщвляли. Все процедуры были одобрены Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию (IACUC) в Центре медицинских наук Университета Техаса в Сан-Антонио, США. Через тридцать минут после инсульта или симуляции (без повреждений) мышам вводили носитель (физиологический раствор) или лекарственные средства (MRS4322, MRS2365, MRS5698 или CI-IBMECA). Оценка посттромботического инфаркта. Размер инфарктов головного мозга оценивали при помощи окрашивания 2,3,5-трифенилтетразолийхлоридом (TTC), как описано в Zheng et al 2010 (PloS One 5 (12): e14401). Вкратце, RB-индуцированные поражения в срезах мозга окрашивали TTC. TTC представляет собой бесцветный краситель, который окрашивает здоровую мозговую ткань в красный цвет при восстановлении митохондриальным ферментом сукцинилдегидрогеназой (Bederson JB et al., 1986). Отсутствие окрашивания в некротической ткани затем используется для определения области инфаркта мозга. Мышей умерщвляли путем смещения шейных позвонков, удаляли мозг и затем помещали в ледяной HBSS на 3 минуты. Затем мозг переносили в форму для мозга (KOPF), нарезали на срезы толщиной 1 мм и погружали в 2% TTC (5 мин) при температуре 37°C. Срезы фиксировали в 10% забуференном растворе формальдегида в течение ночи при температуре 4°C.

Получали изображения срезов при помощи планшетного сканера (HP scanjet 8300) для анализа размера повреждения при разрешении 1200 dpi.

Результаты.

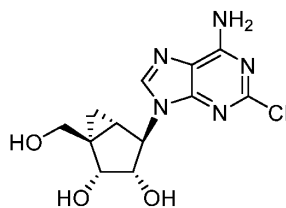
Лечение MRS4322 уменьшает инфаркты мозга после инсульта. Фототромботические инсульты с многососудистым поражением были индуцированы у мышей посредством введения RB через хвостовую вену, как описано выше. В течение 30 минут после образования сгустка мышам внутрибрюшинно вводили носитель (физиологический раствор), MRS4322 (0,16 мг/кг; 0,5 мкмоль/кг) или MRS2365 (0,24 мг/кг; 0,5 мкмоль/кг). Через двадцать четыре часа после начального инсульта размер инфаркта головного мозга оценивали при помощи окрашивания TTC, как описано выше. Репрезентативные TTC-окрашенные срезы мозга представлены на фиг. 13А. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что как MRS4322, так и MRS2365 значительно уменьшили размер инфаркта головного мозга. Гистограммы среднего размера инфарктов головного мозга у мышей, обработанных MRS4322, MRS2365, MRS5698 или CI-IBMECA, представлены на фиг. 13С. Эти данные получены при объединении 2 независимых экспериментов. N обозначает к общее количество мышей в эксперименте. Антагонист рецептора A<sub>3</sub> MRS1523 ингибирует нейропротекцию от лечения MRS4322 и MRS2365 после инсульта. Фототромботические инсульты с многососудистым поражением были индуцированы у мышей, как описано выше. Однако в этом эксперименте мыши получали интраперитонеальные инъекции антагониста рецептора A<sub>3</sub> MRS1523 (2 мг/кг) в моменты времени 0 и 2 часа для обеспечения антагонизма рецептора. Затем мышам инъецировали носитель, MRS4322, MRS2365, MRS5698 или CI-IBMECA в течение 30 минут после образования сгустка при концентрациях, описанных выше. Спустя двадцать четыре часа размеры инфаркта головного мозга оценивали с помощью окрашивания TTC. Репрезентативные TTC-окрашенные срезы мозга представлены на фиг. 13В. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что размер инфарктов головного мозга у мышей, предварительно получавших MRS1523, не уменьшался при лечении MRS4322, MRS2365 или MRS5698. Гистограммы среднего размера инфарктов головного мозга для этих экспериментов представлены на фиг. 13D. Данные получены при объединении 2 независимых экспериментов. N обозначает к общее количество мышей в эксперименте. Пример 7; Нейропротективная эффективность MRS1873 после инсульта у мышей.

Цель.

Это исследование было разработано для определения нейропротективной эффективности MRS1873, который представляет собой соответствующий 2-хлор-аналог MRS4322. Эксперименты выполняли на мышах, подвергнутых инсульту, и сравнивали мышей, получавших MRS4322 и мышей, получавших носитель.

Способы.

Химические реактивы: MRS1873 и MRS4322 были получены благодаря любезности доктора Кена Якобсона из Национального института диабета, болезней органов пищеварения и почек (National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases (Bethesda, MD, США). MRS1873 имеет следующую химическую структуру:



**MRS1873**

Инсульт, вызванный фототромбозом: Фототромбоз выполняли так, как описано в Zheng et al. 2010 (PloS One 5 (12): e14401). Вкратце, бенгальский розовый краситель - это флуоресцентный краситель, который при инъекции в сосудистую сеть и возбуждении генерирует синглетный кислород, который повреждает эндотелиальную стенку и вызывает локальный тромбоз (сгусток). Используя эту технику, мышам в хвостовую вену делали инъекцию 0,1 мл стерилизованного бенгальского розового красителя (RB, Sigma, США) в искусственной спинномозговой жидкости (aCSF).

Концентрация RB составляла 20 мг/мл. Кортикальная область была отцентрирована в поле формирования изображения и освещена зеленым лазером (543 нм, 5 мВт) с использованием 40-кратного иммерсионного объектива 0,8-NA (Nikon, Токио). Образование сгустка контролировали в режиме реального времени до тех пор, пока целевой сосуд или нижележащие капилляры не были плотно закупорены. Стабильные сгустки были впоследствии идентифицированы с помощью нефлуоресцентной сегментации сосудов, заканчивающихся высокофлуоресцентными областями. В контрольных экспериментах лазерное освещение или бенгальский розовый сам по себе не приводили к образованию сгустка. MRS1873 (100 мкл, 100 мкМ) или MRS4322 (100 мкл, 100 мкМ), вводили посредством внутрибрюшинных инъекций (в/б).

Животные и инсульт, вызванный фототромбозом: Инсульт вызывали так, как описано в Zheng et al

2010 (PloS One 5 (12): e14401). В этом исследовании использовали самок мышей C57B1/6 (4-6 месяцев). Из методов этого документа: Мышей анестезировали 3%-ным изофлураном со 100%-ным кислородом и затем поддерживали 1%-ным изофлураном через дыхательный контур. Глубину анестезии контролировали и регулировали в соответствии с показателями жизнедеятельности, реакцией на щипок и морганием глаз. Температуру тела поддерживали на уровне 37°C с помощью электрогрелки, управляемой обратной связью (Gaymar T/Pump). Жизненно важные показатели, включая насыщение кислородом, частоту дыхания и частоту сердечных сокращений, постоянно контролировали с помощью системы MouseOx (STARR Life Sciences). Шерсть на голове мышей выстригали, на голове делали небольшой разрез, обнажающий череп. Изготовленную на заказ пластину из нержавеющей стали приклеивали к черепу с помощью Vet-Bond Tissue Adhesive (3M, Сент-Пол, Миннесота, США). Над правой первичной соматосенсорной корой было создано окно визуализации - участок истонченного черепа (~ 1,5 мм назад от брегмы и 2 мм вбок от средней линии) в зависимости от эксперимента. Вкратце, большую область черепа сначала истончали при помощи электрической дрели, а затем дополнительно истончали хирургическим лезвием. Конечная толщина истонченного черепа составляла примерно 50 мкм. После создания окна визуализации в черепе мыши переходили на стадию микроскопии и использовались для фототромбоза или экспериментов по визуализации. Для повторных экспериментов по визуализации пластину осторожно отделяли от черепа и зашивали кожу головы (шелковая нить Ethicon 6-0). После каждого эксперимента мышей возвращали в клетки до следующего момента времени или умерщвляли. Все процедуры были одобрены Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию (IACUC) в Центре медицинских наук Университета Техаса в Сан-Антонио, США. Через тридцать минут после инсульта или симуляции (без повреждений) мышам вводили носитель (физиологический раствор) или лекарственные средства (MRS4322 или MRS2365).

Оценка посттромботического инфаркта. Размер инфарктов головного мозга оценивали при помощи окрашивания 2,3,5-трифенилтетразолийхлоридом (TTC), как описано в Zheng et al 2010 (PloS One 5 (12): e14401). Вкратце, RB-индуцированные поражения в срезах мозга окрашивали TTC. TTC представляет собой бесцветный краситель, который окрашивает здоровую мозговую ткань в красный цвет при восстановлении митохондриальным ферментом сукцинилдегидрогеназой (Bederson JB et al., 1986). Отсутствие окрашивания в некротической ткани затем используется для определения области инфаркта мозга. Мышей умерщвляли путем смещения шейных позвонков, удаляли мозг и затем помещали в ледяной HBSS на 3 минуты. Затем мозг переносили в форму для мозга (KOPF), нарезали на срезы толщиной 1 мм и погружали в 2% TTC (5 мин) при температуре 37°C. Срезы фиксировали в 10% забуференном растворе формальдегида в течение ночи при температуре 4°C. Получали изображения срезов при помощи планшетного сканера (HP scanjet 8300) для анализа размера повреждения при разрешении 1200 dpi.

#### Результаты.

Лечение MRS1873 уменьшает инфаркты головного мозга после инсульта: Фототромботические инсульты с многососудистым поражением были индуцированы у мышей посредством введения RB через хвостовую вену, как описано выше. В течение 30 минут после образования сгустка мышам внутрибрюшинно вводили носитель (физиологический раствор), MRS1873 ((100 мкл, 100 мкМ) или MRS4322 (100 мкл, 100 мкМ). Через двадцать четыре часа после начального инсульта размер инфаркта головного мозга оценивали при помощи окрашивания TTC, как описано выше. Репрезентативные TTC-окрашенные срезы мозга представлены на фиг. 14В. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что как MRS1873, так и MRS4322 значительно уменьшили размер инфаркта головного мозга. Гистограммы среднего размера инфарктов головного мозга у мышей, обработанных носителем, MRS1873 и MRS4322 представлены на фиг. 14В. Эти данные получены при объединении 3 независимых экспериментов. N обозначает общее количество мышей в эксперименте.

#### Фармакокинетика и обоснование эффективности.

MRS1873 представляет собой 2-Cl аналог MRS4322 и также является агонистом аденозинового рецептора A<sub>3</sub>. Физико-химические свойства MRS1873 аналогичны свойствам MRS4322 в отношении низкого молекулярного веса, гидрофильности (сLogP <0) и топологической полярной площади поверхности. Поскольку параметры всасывания, распределения, метаболизма и выведения/фармакокинетики, такие как связывание с плазмой и мозгом, клиренс и объем распределения, определяются этими физико-химическими свойствами, MRS4322 и MRS1873 демонстрируют сходную фармакокинетику. Кроме того, авторы настоящего изобретения продемонстрировали аналогичную эффективность MRS4322 и MRS1873 в фототромботической модели инсульта у мышей.

Пример 8. Экспериментальный протокол для определения агонизма смещенной активности у соединений на аденозиновом рецепторе A<sub>3</sub> (A<sub>3</sub>R).

Следующий анализ можно применять для определения того, проявляет ли описанное в настоящем документе соединение, такое как MRS4322 или MRS1873, агонизм смещенной активности (также известный как функциональная селективность или миграция агониста) на рецепторе A<sub>3</sub>.

Материалы Fluo-4, модифицированная по Дульбекко среда Игла (DMEM) и пенициллин-стрептомицин можно приобрести в Invitrogen (Карлсбад, Калифорния, США). Аденозин-деаминазу (ADA) и гигромицин-В можно приобрести в Roche (Базель, Швейцария). Фетальную бычью сыворотку

(FBS) можно приобрести в ThermoTrace (Мельбурн, Австралия). AlphaScreen SureFire внеклеточные сигнал-регулируемые киназы 1 и 2 (ERK1/2), Akt 1/2/3 и наборы цАМФ можно приобрести в PerkinElmer (Бостон, Массачусетс, США). Все соединения, в названиях которых есть префикс MRS, можно синтезировать, как описано ранее (Tosh et al., 2012a,b). Все другие реагенты были получены от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, США).

Клеточная культура. Последовательность A<sub>3</sub>R человека можно клонировать в исходном векторе Gateway, pDONR201, а затем перенести в принимающий вектор, pEF5/FRT/V5-dest, с использованием методов, описанных ранее (Stewart et al., 2009). Клетки A<sub>3</sub>-FlpIn-CHO можно получить с использованием способов, описанных ранее (May et al., 2007), и держать при температуре 37°C в увлажненном инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> в DMEM, дополненной 10% FBS и селективным антибиотиком гигромицином-B (500 мкг/мл). Для анализа выживаемости клеток, фосфорилирования ERK1/2, фосфорилирования Akt 1/2/3 и мобилизации кальция клетки можно высевать в 96-луночные культуральные планшеты с плотностью 4×10<sup>4</sup> клеток/лунку. Через 6 часов клетки промывали бессывороточной DMEM и выдерживали в бессывороточной DMEM в течение 12-18 часов при температуре 37°C в 5% CO<sub>2</sub> до анализа. Для анализа цАМФ клетки можно высевать в 96-луночные культуральные планшеты при плотности 2×10<sup>4</sup> клеток/лунку и инкубировать в течение ночи при температуре 37°C в 5% CO<sub>2</sub> до анализа.

Анализ выживаемости клеток. Среду удаляли и заменяли физиологическим раствором, забуференным HEPES (10 mM 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфокислота (HEPES), 146 mM NaCl, 10 mM D-глюкозы, 5 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub> и 1,5 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,45), содержащим ADA (1 ед/мл) и пенициллин-стрептомицин (0,05 ед/мл) в отсутствие и в присутствии лигандов A<sub>3</sub>R. Затем планшеты выдерживали при температуре 37°C в увлажненном инкубаторе в течение 24 часов, после чего к клеткам добавляли 5 мг/мл пропидиум йодида. Затем планшеты можно считывать на планшет-ридере EnVision (PerkinElmer) с возбуждением и излучением, установленными на 320 нм и 615 нм, соответственно. Данные будут нормализованы до 100% выживаемости клеток и 0% выживаемости клеток, определенных при t = 0 часов в буфере HEPES и t = 24 часа в воде качества Milli-Q, соответственно.

Анализ ERK1/2 и фосфорилирования Akt 1/2/3. Кривую концентрация-ответ для ERK1/2 и фосфорилирования Akt 1/2/3 для каждого лиганда можно получить в бессывороточной среде DMEM, содержащей 1 ед/мл ADA (5-минутное воздействие при температуре 37°C). Стимуляцию агонистом можно прекращать путем удаления среды и добавления 100 мкл лизисного буфера SureFire в каждую лунку. Затем планшеты перемешивают в течение 5 минут. Для обнаружения pERK1/2 можно использовать разведение лизат: активационный буфер: реакционный буфер: акцепторные гранулы AlphaScreen: донорные гранулы AlphaScreen 80:20:120:1:1 по объему в общем объеме 11 мл в 384-луночном планшете ProxiPlate. Планшеты можно инкубировать в темноте при температуре 37°C в течение 1 часа с последующим измерением флуоресценции с помощью планшет-ридера EnVision (PerkinElmer) с возбуждением и излучением 630 нм и 520-620 нм, соответственно. Для обнаружения фосфорилирования Akt 1/2/3 можно применять разведение лизат: активационный буфер: реакционный буфер: акцепторные гранулы AlphaScreen 40:9,8:39,2:1 по объему в общем объеме 9 л в 384-луночном планшете ProxiPlate. Планшеты можно инкубировать в темноте при комнатной температуре в течение 2 часов, после чего можно добавлять разбавление буфер для разведения: донорские шарики AlphaScreen 19: 1 по объему в общем объеме 11 мкл. Планшеты можно инкубировать при комнатной температуре 37°C в течение 2 часов с последующим измерением флуоресценции с помощью планшет-ридера EnVision (PerkinElmer) с возбуждением и излучением 630 нм и 520-620 нм, соответственно. Кривые концентрация-ответ агониста нормализованы к фосфорилированию, опосредованному 10% FBS (5-минутная стимуляция).

Анализ мобилизации кальция. Среды можно удалять из 96-луночных планшетов и заменять физиологическим раствором, забуференным HEPES, содержащим 1 ед/мл ADA, 2,5 mM пробенецида, 0,5% бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 1 M Fluo4. Планшеты можно инкубировать в темноте в течение 1 часа при температуре 37°C в увлажненном инкубаторе. При помощи планшет-ридера FlexStation (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния, США) можно выполнять добавление физиологического раствора, забуференного HEPES, в отсутствие и в присутствии агониста, и измерять флуоресценцию (возбуждение, 485 нм; излучение, 520 нм) каждые 1,52 секунды в течение 75 секунд. Можно измерить разницу между пиком и базовой флуоресценцией в качестве маркера внутриклеточной мобилизации Ca<sup>2+</sup>. Кривые зависимости концентрация-ответ для агониста A<sub>3</sub>R можно нормализовать к ответу, опосредованному 100 мкМ АТФ для учета различий в числе клеток и степени загрузки.

Анализ ингибирования накопления цАМФ. Среду можно заменить стимулирующим буфером (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,8 M MgSO<sub>4</sub>, 0,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 5,6 mM D-глюкозы, 5 mM HEPES, 0,1% BSA, 1 ед/мл ADA и 10 мкМ ролипрама, pH 7,45) и инкубировать при температуре 37°C в течение 1 часа.

Ингибирование накопления цАМФ можно оценивать путем предварительной инкубации клеток A<sub>3</sub>-FlpIn-CHO с агонистами A<sub>3</sub>R в течение 10 минут, после чего добавляют 3 мкМ форсколина в течение еще 30 минут. Реакцию можно остановить быстрым удалением буфера и добавлением 50 мкл охлажденного льдом 100% этанола. Этанолу давали испариться, затем добавляли 50 мкл буфера для обнаружения (0,1%

BSA, 0,3% Tween-20, 5 mM HEPES, pH 7,45). Планшеты перемешивали в течение 10 минут, после чего 10 мкл лизата переносили в 384-луночный Optiplate. Для обнаружения можно использовать добавление 5 мкл разведения акцепторные гранулы AlphaScreen: стимулирующий буфер 1:49 по объему. После этого добавляли 15 мкл разведения донорские гранулы AlphaScreen: буфер для обнаружения: 3,3 ед/мкл биотинилированного цАМФ 1:146:3 по объему с получением общего объема 30 мкл. Смесь донорские гранулы/биотинилированный цАМФ можно уравнивать в течение 30 минут перед добавлением. Планшеты можно инкубировать в течение ночи в темноте при комнатной температуре с последующим измерением флуоресценции с помощью планшет-ридера EnVision (PerkinElmer) с возбуждением и излучением 630 нм и 520–620 нм, соответственно. Кривые концентрация-ответ агониста можно нормализовать к ответу, опосредованному 3 мкМ форсколина (0%) или буфера (100%).

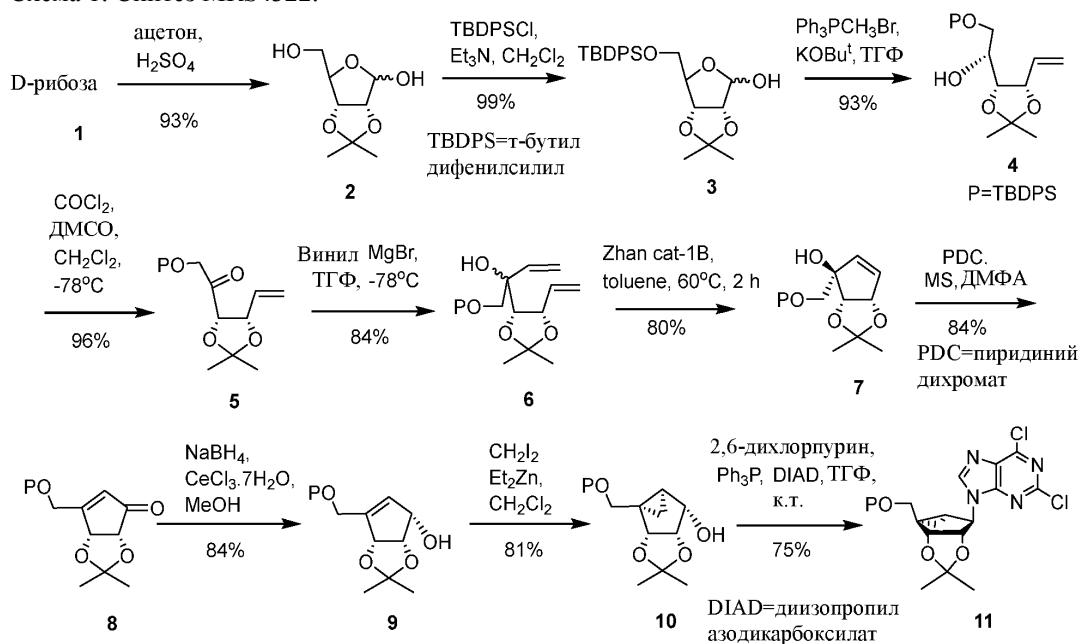
Молекулярное моделирование. Моделирование с помощью метода докинга можно выполнять для всех соединений, исследованных в этих экспериментах, с использованием гомологичных моделей A<sub>3</sub>R человека. В частности, можно использовать три модели, о которых сообщалось ранее: модель, полностью основанную кристаллической структуре связанного агониста hA<sub>2A</sub>AR (PDB ID: 3QAK), модель на основе гибридной матрицы A<sub>2A</sub>AR-β2 адренергического рецептор, и модель на основе гибридной матрицы A<sub>2A</sub>AR-опсин (рентгеновская структура β2 адренорецептора PDB ID: 3SN6; кристаллическая рентгеновская структура опсина PDB ID: 3DQB) (Tosh et al, 2012a). Модели, основанные на гибридных шаблонах, будут показывать внешнее движение TM2 по сравнению с моделью на основе A<sub>2A</sub>AR. Структуры лигандов A<sub>3</sub>R можно построить и подготовить для метода докинга при помощи инструментов Builder и LigPrep, реализованных в наборе программ Schrödinger (Schrödinger Release 2013-3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2013). Моделирование лигандов с помощью метода молекулярного докинга на моделях A<sub>3</sub>R можно осуществлять с помощью пакета Glide из набора программ Schrödinger. В частности, Glide Grid можно центрировать на центроиде некоторых ключевых остатков связывающего кармана аденозиновых рецепторов, а именно Phe (EL2), Asn (6,55), Trp (6,48) и His (7,43). Glide Grid можно построить с использованием внутреннего поля (поля центральной точки лиганда) размером 14×14×14 Å и внешнего поля (поля, в котором должны содержаться все атомы лиганда), которое простирается на 25 Å в каждом направлении от внутреннего. Моделирование лигандов с помощью метода молекулярного докинга можно выполнять в жестком сайте связывания с использованием процедуры XP (дополнительная точность). Конформации с наивысшей оценкой для каждого лиганда можно подвергать визуальному осмотру и анализу взаимодействий белок-лиганд для того, чтобы выбрать предлагаемые конформации, соответствующие экспериментальным данным.

Анализ данных. Статистический анализ и подбор кривой можно выполнить с использованием программы Prism 6 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США). Чтобы количественно определить смещение передачи сигналов, кривые концентрации-ответа агонистов можно анализировать с помощью нелинейной регрессии с использованием производной модели агонизма Блэк-Леффа, как описано ранее (Kenakin et al, 2012; Wootten et al., 2013; van der Westhuizen et al., 2014). Коэффициент трансдукции, τ/KA [выраженный в виде логарифма, Log (τ/KA)], можно использовать для количественной оценки агонизма смещенной активности. Чтобы учесть клеточно-зависимые эффекты на реакцию агониста, коэффициент трансдукции можно нормализовать к значениям, полученным для эталонного агониста, IB-MECA, с получением ALog(τ/KA). Чтобы определить смещение для каждого агониста на разных сигнальных путях, ALog(τ/KA) будет нормализован к эталонному пути, pERK1/2, с получением AAlog(τ/KA). Смещение можно определить как 10<sup>AAlog(τ/KA)</sup>, где отсутствие смещения приведет к значениям, которые статистически не отличаются от 1 или 0, когда выражены в виде логарифма. Все результаты могут быть выражены как среднее значение ± SEM. Статистический анализ будет включать F-тест или односторонний дисперсионный анализ с помощью специального теста Тьюки или Даннетта, статистическая значимость которого определена как P, 0,05.

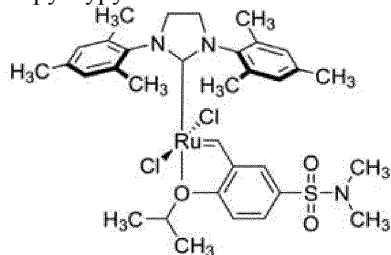
Пример 9. Схема синтеза MRS4322.

MRS4322 и подобные соединения, такие как MRS1873, можно получить в соответствии со способами, известными в данной области. Например, MRS4322 можно получить из D-рибозы следующими путями, описанными в Choi, W. J. et al. J. Org. Chem. 2004, 69, 2634-2636, Tosh, D. K. et al. Purinergic Signaling 2015, 11, 371-387; and Chem. Eur. J., 2009, 15, 6244-6257. Схема синтеза приведена на схемах 1 и 2 ниже.

Схема 1: Синтез MRS4322.

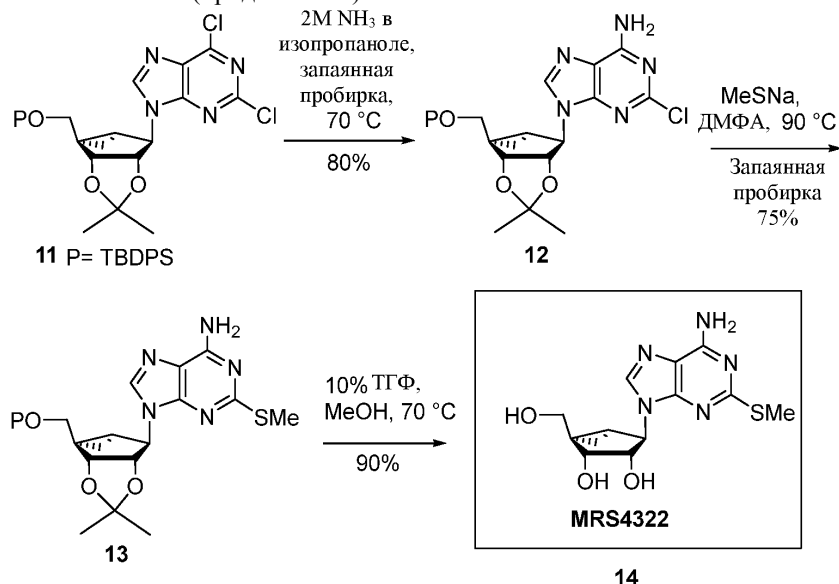


Zhan cat-1B имеет следующую структуру:



Оставшаяся часть синтеза приведена на схеме 2.

Схема 2: Синтез MRS4322 (продолжение).



Пример 10. Обоснование кардиопротективного действия описанных соединений.

Авторы настоящего изобретения продемонстрировали чрезвычайно быстрое и количественное дефосфорилирование агонистов P2Y1 до соединений, таких как MRS4322, которые являются агонистами аденозиновых рецепторов A3. Было неожиданно обнаружено, что эти агонисты аденозиновых рецепторов A3 эффективны в нескольких описанных в настоящем документе моделях инсульта и черепно-мозговой травмы у мышей. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, полагают, что описанные в настоящем документе агонисты A3, такие как MRS4322 и MRS1873, эффективны в качестве кардиопротективных агентов.

Полученные авторами настоящего изобретения данные, показывающие быстрое и количественное



дефосфорилирование MRS2365 и связанные фосфорилированные нуклеозиды до соединений, таких как MRS4322 и MRS1873, подтверждают утверждение о том, что предполагаемая кардиопротективная эффективность этих агонистов P2X<sub>4</sub> фактически обусловлена агонизмом аденозинового рецептора A<sub>3</sub> их дефосфорилированных метаболитов. Действительно, авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что MRS1873 является агонистом аденозинового рецептора A<sub>3</sub>, который эффективен в моделях инсульта и черепно-мозговой травмы.

Пример 11. Фармакокинетика и связывание MRS4322 после внутривенного введения новорожденным пороссятам.

Цель.

Это исследование было разработано для определения концентрации MRS4322 в плазме, мозге и спинномозговой жидкости (CSF) после внутривенного введения новорожденным пороссятам.

Способы.

Химические реактивы. MRS4322 был получен благодаря любезности доктора Кена Якобсона из Национального института диабета, болезней органов пищеварения и почек (National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, США). Животные. Для этого исследования использовали самок новорожденных пороссят в возрасте 4 недель весом примерно 7,5 кг, предоставленных Департаментом биоинженерии университета Пенсильвании (Филадельфия, Пенсильвания, США). Животных снабжали датчиками микродиализа мозга для получения образцов внеклеточной жидкости головного мозга для определения концентрации лекарственного средства во время исследования. Все исследования проводились в соответствии с утвержденными Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию протоколами Центра медицинских наук университета Пенсильвании.

Введение лекарственных средств: MRS4322 солибилизовали в ДМСО, а затем разбавляли физиологическим раствором с получением дозирочного раствора. Каждому новорожденному поросенку вводили 10 мл дозированного раствора при помощи внутривенного струйного введения (n = 3).

Отбор проб ткани: Образцы крови получали через 0,25, 0,5, 1, 2, 4 и 6 часов после введения дозы. Образцы внеклеточной жидкости головного мозга получали при помощи имплантированных зондов микродиализа через 1, 4 и 6 часов после введения дозы. Цельную кровь (1 мл) получали в каждый момент времени и помещали в пробирки с вакуумом, содержащие гепарин, и сразу же центрифугировали для приготовления плазмы; плазму хранили при температуре -80°C. Образцы внеклеточной и спинномозговой жидкости мозга хранили при температуре -80°C. Во время умерщвления (через 6 часов после введения дозы) получали образцы спинномозговой жидкости и замораживали их, при этом образцы головного мозга из коры и гиппокампа отбирали путем декапитации, затем мозг промывали в ледяном забуференном фосфатом физиологическом растворе и взвешивали. Затем образцы мозга немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C.

Биоанализ.

Концентрации MRS4322 в плазме, мозге, внеклеточной жидкости головного мозга и спинномозговой жидкости определяли методом ЖХ-МС/МС с использованием толбутамида в качестве внутреннего стандарта. В следующей таблице приведены используемые условия ЖХ и МС/МС:

Биоаналитические методы для определения концентрации MRS4322 в плазме, мозге, внеклеточной и спинномозговой жидкости мозга

<b>Системные компоненты</b>			
Модуль ЖХ	Производитель Waters	Модель Acquity I Class	
Автопробоотборник	Waters	Acquity Sample Manager	
Определение МС	AB Sciex	API 5500 QQQ	
<b>Метод ВЭЖХ</b>			
Колонка	Phenomenex Kinetex C18 (2,1 x 50 мм, 2,6 мкм)		
Элюирование	Градиент, 0,6 мл/мин Мобильная фаза А: 0,1% муравьиная кислота Мобильная фаза В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле		
<b>Обнаружение и калибровка MRS4322 в плазме свиньи по МС</b>			
Название пика: Толбутамид			
Использование в качестве внутреннего стандарта			
Q1/Q3 массы: 271,00/155,00 Да			
Название пика: MRS4322			
Внутренний стандарт: Толбутамид			
Q1/Q3 массы: 324,08/182,10 Да			
Подгонка	Линейн.	Взвешивание	1 / x
Точка пересечения	0,000570		
Наклон	0,00699		
Коэффициент корреляции	0,9998		
Область применения			
<b>Обнаружение и калибровка MRS4322 в гомогенате мозга свиньи по МС</b>			
Название пика: Толбутамид			
Использование в качестве внутреннего стандарта			
Q1/Q3 массы: 271,00/155,00 Да			
Название пика: MRS4322			
Внутренний стандарт: Толбутамид			
Q1/Q3 массы: 324,08/182,10 Да			
Подгонка	Квадр.	Взвешивание	1 / x
a0	0,000244		
a1	0,00675		
a2	-0,00000134		
Коэффициент корреляции	0,9999		
Область применения			
<b>Обнаружение и калибровка MRS4322 в ECF и CSF свиньи по МС</b>			
Название пика: Толбутамид			
Использование в качестве внутреннего стандарта			
Q1/Q3 массы: 271,00/155,00 Да			
Название пика: MRS4322			
Внутренний стандарт: Толбутамид			
Q1/Q3 массы: 324,08/182,10 Да			
Подгонка	Квадр.	Взвешивание	1 / x
a0	0,000297		
a1	0,00783		
a2	0,000000130		
Коэффициент корреляции	0,9998		
Область применения			

Для каждого тканевого матрикса были созданы стандартные кривые и определены концентрации НПКО/ВПКО. Диапазон калибровки для стандартных кривых MRS4322 для всех матриц составлял 0,1-1000 нг/мл.

Для биоанализа концентраций MRS4322 в головном мозге образцы мозга гомогенизировали в охлажденном льдом физиологическом растворе с фосфатным буфером в 4-кратном разведении. Аликвоты полученного разбавленного гомогената мозга обрабатывали ацетонитрилом и анализировали методом ЖХ-МС/МС.

Результаты.

После внутривенного введения новорожденным пороссятам определяли концентрации MRS4322 в образцах плазмы, головного мозга, внеклеточной жидкости головного мозга и спинномозговой жидкости (фиг. 1В и фиг. 16, табл. 13).

Таблица 13

Концентрации MRS4322 в плазме, мозге, внеклеточной жидкости головного мозга и спинномозговой жидкости у новорожденных поросят после внутривенного введения

Тестир. соед.	Матрица	Путь	Доза (мг/кг)	Время (ч)	Конц. в плазме (нг/мл) по субъектам					
					161128U	161128U-1	161128U-2	Средн.	SD	N
MRS4322	Плазма	В/В	0.2	0	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				0.25	133	120	163	139	22	3
				0.5	85.3	54.1	98.7	79.4	22.9	3
				1	58.9	51.4	63.0	57.8	5.9	3
				2	27.2	18.7	46.8	30.9	14.4	3
				4	23.3	21.9	28.7	24.6	3.6	3
				6	15.3	9.08	20.8	15.1	5.9	3
Тестир. соед.	Матрица	Путь	Доза (мг/кг)	Время (ч)	Конц. в мозге (нг/г) по субъектам					
					161128U	161128U-1	161128U-2	Средн.	SD	N
MRS4322	Кора гол. мозга	В/В	0.2	6	5.34	3.80	6.15	5.10	1.19	3
	Гиппокамп				6.47	4.56	5.39	5.47	0.96	3
Тестир. соед.	Матрица	Путь	Доза (мг/кг)	Время (ч)	Конц. во внеклеточн. жидк. (нг/мл) по субъектам					
					161128U	161128U-1	161128U-2	Средн.	SD	N
MRS4322	ECF	В/В	0.2	1	1.55	0.641	1.70	1.30	0.57	3
				4	0.893	0.579	1.35	0.941	0.388	3
				6	0.602	0.459	1.08	0.714	0.325	3
Тестир. соед.	Матрица	Путь	Доза (мг/кг)	Время (ч)	Конц. в спинномозг. жидк. (нг/мл) по субъектам					
					161128U	161128U-1	161128U-2	Средн.	SD	N
MRS4322	CSF	В/В	0.2	6	1.37	1.04	1.75	1.39	0.36	3

BLQ = ниже предела количественного определения (0,0975 нг/мл для плазмы).

Таблица 14

Фармакокинетика MRS4322 у новорожденных поросят после внутривенного введения

Тестир. соед.	Путь	Доза (мг/кг)	ID животн.	C <sub>0</sub> (нг/мл)	C <sub>max</sub> (нг/мл)	T <sub>max</sub> (ч)	AUC <sub>last</sub> (ч*нг/мл)	AUC <sub>INF</sub> (ч*нг/мл)	Cl (мл/мин/кг)	V <sub>z</sub> (л/кг)	Полувывед. (ч)
MRS4322	В/В	0.2	161128U	207	133	0.25	238	344	9.68	4.04	4.82
			161128U-1	266	120	0.25	203	233	14.3	2.86	2.31
			161128U-2	269	163	0.25	307	401	8.31	2.25	3.13
			N	3	3	3	3	3	3	3	3
			Средн.	248	139	0.25	249	326	10.8	3.05	3.42
			SD	34.9	22.1	0.00	52.9	85.3	3.13	0.907	1.28
			CV%	14.1	15.9	0.0	21.2	26.1	29.1	29.8	37.4

Концентрации в плазме позволили получить начальные оценки T<sub>max</sub>, C<sub>max</sub>, клиренса в плазме, объема распределения, периода полувыведения и AUC (табл. 14). Хотя концентрации MRS4322 в мозге, внеклеточной жидкости головного мозга и спинномозговой жидкости были обнаруживаемыми, данных было недостаточно для оценки периода полураспада или других фармакокинетических параметров, кроме C<sub>max</sub> и T<sub>max</sub>. Однако исходя из имеющихся данных, полученных для плазмы крови и мозга через 6 часов после введения дозы, когда были получены образцы всех матриц, было установлено, что отношение в мозгу/в плазме общего лекарственного средства составляло примерно 0,3 на основе средних концентраций в плазме и мозге.

Эти результаты подтверждают, что концентрации циркулирующего MRS4322 в плазме крови обнаруживаются после внутривенного введения новорожденным поросятам, и что MRS4322 хорошо распространяется в мозг в этих условиях дозирования.

Пример 12. Связывание MRS4322 в плазме и мозге новорожденных поросят.

Цель.

Это исследование было разработано для определения свободной фракции MRS4322 в плазме крови и мозге у новорожденных поросят.

Способы.

Химические реактивы. MRS4322 был получен благодаря любезности доктора Кена Якобсона из Национального института диабета, болезней органов пищеварения и почек (National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, США). Сульфаметоксазол и варфарин аналитического качества были получены из коммерческих поставок в Seventh Wave Laboratories (Maryland Heights, MO, США). Все другие химические вещества были получены от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, США).

Подготовка животных и тканей. Образцы плазмы и головного мозга самок новорожденных поросят были получены из Университета Пенсильвании и хранились при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  до использования.

Пустые образцы ультрафильтрата плазмы готовили путем оттаивания замороженной плазмы, а затем предварительного нагревания плазмы в увлажненной камере с 5%  $\text{CO}_2$  при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 60 минут. Аликвоты по 800 мкл переносили в центробежный фильтр Centrifree (регенерированная целлюлоза Ultracel (NMWL 30000 а.е.м.), партия R5JA31736) и центрифугировали при 2900 об/мин при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 10 минут; фильтрат плазмы и воды собирали и использовали для подготовки стандартов, пустых образцов и стандартов контроля качества.

Мозг взвешивали и гомогенизировали с 1:9 физиологическим раствором с осфатным буфером, pH 7,4, при помощи гомогенизатора тканей Omni. Мозг от четырех мышей гомогенизировали, объединяли и смешивали с получением одного образца. Определение связывания плазмы. MRS4322, сульфаметаксазол и варфарин солибилизировали в ДМСО и затем разбавляли смесью ацетонитрил:вода 1:1 с получением 100 мкМ исходных диализных растворов. Сульфаметаксазол и варфарин использовали в качестве стандартов исследования с известными значениями связывания в плазме. Образцы плазмы предварительно нагревали в течение 60 минут в увлажненном инкубаторе с 5%  $\text{CO}_2$ , в котором поддерживали температуру  $37^{\circ}\text{C}$ . В аликвоты по 3 мл предварительно нагретой плазмы добавляли MRS4322, сульфаметаксазол или варфарин, используя 100 мкМ исходные растворы каждого соединения с получением конечных концентраций 1 мкМ. Образцы плазмы с добавками определяемых соединений инкубировали в роторной мешалке в увлажненной камере с 5%  $\text{CO}_2$  при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в течение минимум 60 минут. Через 60 минут три аликвоты по 800 мкл каждого образца добавляли в центробежный фильтр Centrifree и подвергали центрифугированию при 2900 об/мин в течение 10 минут при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . Три 100 мкл аликвоты остаточной плазмы собирали вместе с ультрафильтратом для биоанализа.

Определение связывания в мозге: MRS4322, сульфаметаксазол и варфарин солибилизировали в ДМСО и разбавляли смесью ацетонитрил:вода 1:1 с получением 100 мкМ исходных диализных растворов. Объединенные гомогенизированные образцы мозга предварительно нагревали в течение 60 минут в увлажненном инкубаторе с 5%  $\text{CO}_2$ , в котором поддерживали температуру  $37^{\circ}\text{C}$ . В аликвоты по 3 мл гомогената головного мозга добавляли MRS4322, сульфаметаксазол или варфарин, используя 100 мкМ исходные растворы для каждого соединения с получением конечной концентрации 1 мкМ. Объединенные гомогенаты мозга с добавками определяемых соединений помещали на смесителе Nutator в увлажненный инкубатор с 5%  $\text{CO}_2$  при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 60 минут. Через 60 минут три аликвоты по 800 мкл каждого образца добавляли в центробежный фильтр Centrifree и подвергали центрифугированию при 2900 об/мин в течение 10 минут при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . Аликвоты остаточного гомогената мозга и ультрафильтрата собирали для биоанализа.

Биоанализ.

Концентрации MRS4322 в плазме и мозге в образцах плазмы, гомогенатах мозга и связанных ультрафильтратах с добавками определяемых соединений определяли методом ЖХ-МС/МС с использованием толбутамида в качестве внутреннего стандарта. Связанные концентрации сульфаметаксазола и варфарина также определяли методом ЖХ-МС/МС с использованием стандартных условий (данные не показаны). В следующих таблицах приведены используемые условия ЖХ и МС/МС (табл. 15 и 16). Биоаналитические методы были идентичны для всех тканей; статистику стандартной кривой (например, Fit, Intercept, Slope, Correlation Coe factor) определяли для каждой ткани, но они существенно не отличались и, следовательно, не приведены для каждой ткани.

Таблица 15

Биоаналитические методы для MRS4322 для определения концентраций в плазме, гомогенате мозга, ультрафильтрате плазмы и ультрафильтрате гомогената мозга. Биоанализ образцов плазмы, гомогенатов мозга, ультрафильтратов плазмы и ультрафильтратов гомогената мозга

Системные компоненты			
Модуль	Производитель	Модель	
ВЭЖХ	Shimadzu	Бинарные насосы Prominence LC20AD	
Автопроботборник	CTC Leap	HTC PAL	
Масс-спектрометр	AB Sciex	API 4000	
Метод ВЭЖХ			
Колонка	Phenomenex Kinetex C18 (2,1 x 50 мм, 2,6 мкм)		
Элюирование	Градиент, 0,4 мл/мин Мобильная фаза А: 0,1% муравьиная кислота в воде Мобильная фаза В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле		
Условия масс-спектрометрии для MRS4322			
Название пика: MRS4322 Q1/Q3 массы: 324,10/182,00 Да			
Название пика: Толбутамид Q1/Q3 массы: 271,20/155,20 Да			
Подгонка	Линейн.	Взвешивание	1 / x
Точка пересечения	0,0181		
Наклон	0,00192		
Коэффициент корреляции	0,9988		

Для каждой матрицы были созданы стандартные кривые и определены концентрации НПКО/ВПКО. Диапазон калибровки для стандартных кривых концентрации MRS4322 в плазме составлял 5-1000 нМ. Диапазон калибровки для стандартных кривых ультрафильтратов плазмы MRS4322 составлял 5-1000 нМ. Диапазоны калибровки для стандартных кривых гомогената мозга и ультрафильтрата гомогената мозга для MRS4322 составляют 5-1000 нМ и 5-1000 нМ, соответственно.

Результаты.

Связывание с плазмой и свободную фракцию определяли для MRS4322 с использованием ультрафильтрации плазмы. Связывание с плазмой составляло 21,6% для MRS4322; соответствующая свободная фракция составляла 0,784 (табл. 16). Связывание стандартов исследования сульфаметаказола и варфарина соответствовало литературным значениям.

Таблица 16

Несвязанная фракция и связывание MRS4322 в плазме новорожденных поросят

Субстрат	Несвязанная фракция		% связывания		N
	Среднее	СО	Среднее	СО	
MRS4322	0,784	0,061	21,6	6,1	3
Сульфаметаказол	0,606	0,016	39,4	1,6	2
Варфарин	0,0159	0,0021	98,4	0,2	3

\* Концентрации MRS5698 в ультрафильтрате плазмы были BLQ (ниже предела количественного определения).

Связывание в мозге и свободную фракцию определяли для MRS4322 с использованием ультрафильтрации гомогенатов мозга. Связывание в мозге составляло 74,7% для MRS4322; соответствующая свободная фракция составляла 0,253 (табл. 17). Связывание стандартов исследования сульфаметаказола и варфарина соответствовало литературным значениям.

Таблица 17

Несвязанная фракция и связывание MRS4322 в гомогенатах мозга новорожденных поросят

Субстрат	Несвязанная фракция		% связывания		N
	Среднее	СО	Среднее	СО	
MRS4322	0,253	0,043	74,7	4,3	3
Сульфаметаказол	0,309	0,029	69,1	2,9	3
Варфарин	0,189	0,006	81,1	0,6	3

Эти данные указывают на то, что для данной общей концентрации в плазме или мозге значительные несвязанные концентрации лекарственного средства MRS4322 будут доступны в мозге для взаимодействия с аденозиновым рецептором А3. Эти данные согласуются с данными, которые наблюдались на мышях.

Пример 13. Фармакологическая характеристика MRS4322.

Для соединения MRS4322 проводили исследования конкурентного связывания на аденозиновых рецепторах Аз человека и мыши, рекомбинантно экспрессируемых в клетках яичников китайского хомячка (CHO) с использованием препаратов клеточных мембран. [<sup>3</sup>H]NECA использовали в качестве ра-

диолиганда агониста  $A_3$ . Можно применять неселективный агонист NECA, поскольку клетки CHO нативно не экспрессируют аденозиновые рецепторы. Было определено зависимое от концентрации вытеснение радиолиганда с помощью MR4322.

Кроме того, эксперименты с цАМФ были проведены в клетках CHO, рекомбинантно экспрессирующих аденозиновые рецепторы  $A_3$  человека или мыши, соответственно. Неселективный агонист NECA использовали в качестве контроля.

Результаты.

MRS4322 показал значение  $K_i$   $1490 \pm 410$  нМ для рецепторов  $A_3$  человека и значение  $K_i$   $4940 \pm 974$  нМ для рецепторов  $A_3$  мыши в исследованиях радиолигандного связывания по сравнению с [ $^3H$ ]NECA.

В экспериментах по накоплению цАМФ в клетках CHO, экспрессирующих аденозиновые рецепторы  $A_3$ , MRS4322 продемонстрировал агонистическую активность со значением  $EC_{50}$   $3630 \pm 370$  нМ для рецептора  $A_3$  человека и со значением  $EC_{50}$   $759 \pm 170$  нМ для рецептора  $A_3$  мыши. Значения  $EC_{50}$  агонистов на GPCR зависят от уровня экспрессии рецептора. Клеточная линия  $A_3$ -рецептора человека, по-видимому, имеет более низкий уровень экспрессии, чем клеточные линии с  $A_3$ -рецепторами мыши, поскольку наблюдаются более высокие значения  $EC_{50}$ , что также имело место для контрольного агониста NECA.

Таблица 18

Сродство агонистов к аденозиновым рецепторам, стабильно экспрессируемым в клетках CHO, определенное в исследованиях радиолигандного связывания [ $K_i \pm SEM$  (нМ)]

Рецептор	$A_3R$ человека	$A_3R$ мыши
Агонист	[ $^3H$ ]NECA	[ $^3H$ ]NECA
MRS4322	$1490 \pm 410$	$4940 \pm 974$
NECA	$6,18 (K_D)^a$	$15,1 (K_D)^a$

<sup>a</sup>Alnouri M.W. et al. Selectivity is species-dependent: Characterization of standard agonists and antagonists at human, rat, and mouse adenosine receptors. Purinergic Signal. 2015, 11, 389-407. В опубликованном исследовании и в настоящем исследовании использовали одни и те же клеточные линии.

Таблица 19

Потенциалы агонистов аденозиновых рецепторов  $A_3$ , стабильно экспрессируемых в клетках CHO, определенные в анализах накопления цАМФ

	$A_3R$ человека	$A_3R$ мыши
	<b><math>EC_{50} \pm SEM</math> (нМ)</b> (эффективность при концентрации 100 мкМ в % относительно максимального эффекта NECA)	
Агонист		
MRS4322	$3630 \pm 370$	$759 \pm 170$
	$(70 \pm 12)$	$(72 \pm 18)$
NECA	$41,8 \pm 6,3$	$6,85 \pm 0,88$

На фиг. 17 показаны результаты экспериментов по конкурентному связыванию MRS4322 по сравнению с радиолигандом агонистом  $A_3$  [ $^3H$ ]NECA (10 нМ) на рецепторах  $A_3$  человека, экспрессируемых в клетках CHO. Расчетное значение  $K_i$  для MRS4322 составляло  $1490 \pm 410$  нМ.

На фиг. 18 показаны результаты экспериментов по конкурентному связыванию MRS4322 по сравнению с радиолигандом агонистом  $A_3$  [ $^3H$ ]NECA (10 нМ) на рецепторах  $A_3$  мыши, экспрессируемых в клетках CHO. Расчетное значение  $K_i$  для MRS4322 составляло  $4940 \pm 974$  нМ. На фиг. 19 показаны результаты экспериментов по аккумуляции цАМФ для MRS4322 и NECA на рецепторах  $A_3$  человека, экспрессированных в клетках CHO. Расчетное значение  $EC_{50}$  для MRS4322 составляло  $3630 \pm 370$  нМ; для NECA было определено значение  $EC_{50}$   $41,8 \pm 6,3$  нМ. На фиг. 20 показаны результаты экспериментов по аккумуляции цАМФ для MRS4322 и NECA на рецепторах  $A_3$  мыши, экспрессированных в клетках CHO. Расчетное значение  $EC_{50}$  для MRS4322 составляло  $759 \pm 170$  нМ; для NECA было определено значение  $EC_{50}$   $6,85 \pm 0,88$  нМ.

Эти результаты ниже, чем известные данные по связыванию для MRS1873, но связаны с ними. Значения  $K_i$  для  $A_3$  человека: MRS1873  $K_i = 353$  нМ;  $EC_{50} = 803$  нМ, опубликовано в: J. Med. Chem. 2002 45:4471-4484. "Structural Determinants of  $A_3$  Adenosine Receptor Activation: Nucleoside Ligands at the Ago-

nist/Antagonist Boundary," Gao, Z-G. et al. В более ранней статье указано, что  $K_i$  для  $A_3$  человека составляет 85 нМ: Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 2001 11:1333-1337. "Ring-Constrained (N)-Methanocarpa Nucleosides as Adenosine Receptor Agonists: Independent 5'-Uronamide and 2'-Deoxy Modifications," Lee, K. et al.

Хотя описан ряд вариантов реализации настоящего изобретения, понятно, что конкретные примеры, описанные выше, можно изменять с использованием рутинных экспериментов для обеспечения других вариантов реализации, в которых применяются соединения и способы согласно настоящему изобретению. Следовательно, следует понимать, что объем настоящего изобретения определяется только приведенной ниже формулой изобретения, а не конкретными описанными вариантами реализации.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения повреждения, заболевания или состояния, выбранного из:

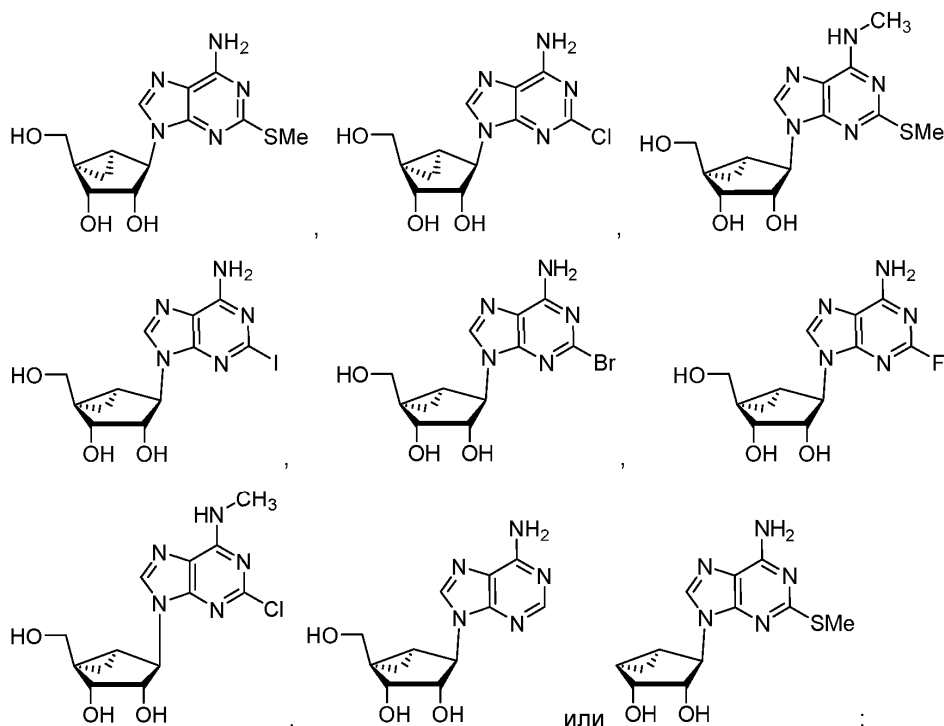
(i) черепно-мозговой травмы (ЧМТ);

(ii) инсульта;

(iii) нейродегенеративного состояния, выбранного из болезни Альцгеймера (БА), болезни Паркинсона (БП), бокового амиотрофического склероза (БАС), хронической травматической энцефалопатии (ХТЭ) и нейродегенеративного состояния, вызванного черепно-мозговой травмой, сотрясением мозга, инсультом, частичной или полной перерезкой спинного мозга, недоеданием, токсической невропатией, менингоэнцефалопатией или возрастной нейродегенерацией; и

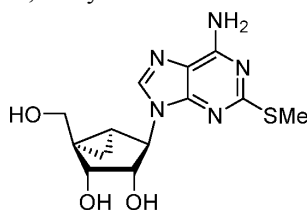
(iv) заболевания сердца или сердечно-сосудистого заболевания, выбранного из ишемии сердца, инфаркта миокарда, кардиомиопатии, ишемической болезни сердца, аритмии, миокардита, перикардита, стенокардии, гипертонической болезни сердца, эндокардита, ревматической болезни сердца, врожденного порока сердца и атеросклероза;

включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества агониста  $A_3$  аденозинового рецептора ( $A_3R$ ); где указанный агонист представляет собой



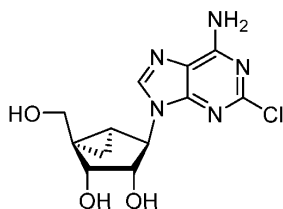
или фармацевтически приемлемую соль указанного соединения.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный агонист представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный агонист представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанное повреждение, заболевание или состояние представляет собой ЧМТ.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что указанная ЧМТ выбрана из сотрясения мозга, повреждения ударной волной, повреждения, полученного при участии в боевых действиях, и легкого, среднего или сильного удара по голове.

6. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанное повреждение, заболевание или состояние представляет собой инсульт, выбранный из ишемического инсульта, геморрагического инсульта, субарахноидального кровоизлияния, спазма сосудов головного мозга и преходящих нарушений мозгового кровообращения (ПНМК).

7. Способ по любому из пп.4-6, отличающийся тем, что у указанного пациента усиливается нейропротекция или нейрорепарация по сравнению с пациентом, не получавшим лечение.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что он усиливает нейропротекцию или нейрорепарацию у пациента, который перенес ЧМТ или инсульт.

9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что указанный агонист или его фармацевтически приемлемую соль вводят в течение 24 ч после ЧМТ или инсульта.

10. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что указанный агонист или его фармацевтически приемлемую соль вводят в течение 8 ч после ЧМТ или инсульта.

11. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что указанный агонист или его фармацевтически приемлемую соль вводят в течение по меньшей мере первых 8-48 ч после ЧМТ или инсульта.

12. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанное повреждение, заболевание или состояние представляет собой нейродегенеративное заболевание, выбранное из болезни Альцгеймера (БА), болезни Паркинсона (БП), бокового амиотрофического склероза (БАС) и нейродегенеративного состояния, вызванного черепно-мозговой травмой, сотрясением мозга, инсультом, частичной или полной перерезкой спинного мозга.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что указанное нейродегенеративное заболевание представляет собой боковой амиотрофический склероз (БАС).

14. Способ по п.12, отличающийся тем, что указанное повреждение, заболевание или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера.

15. Способ по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что период восстановления после ЧМТ или инсульта сокращается по сравнению с пациентом, не получавшим лечения.

16. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанное повреждение, заболевание или состояние представляет собой заболевание сердца или сердечно-сосудистое заболевание, выбранное из ишемии сердца, инфаркта миокарда, кардиомиопатии, миокардита, перикардита, стенокардии, эндокардита, ревматической болезни сердца.

17. Способ по п.16, отличающийся тем, что указанное заболевание сердца или сердечно-сосудистое заболевание представляет собой ишемию сердца или инфаркт миокарда.

18. Способ по п.16 или 17, отличающийся тем, что указанный способ усиливает кардиопротекцию или регенерацию поврежденной ткани сердца.

19. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанный агонист вводят длительно для лечения инсульта, ишемии сердца или инфаркта миокарда в течение периода времени с появления указанного повреждения до его устранения.

20. Способ по любому из пп.1-19, отличающийся тем, что  $A_3R$  частично агонизирован.

21. Способ по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что  $A_3R$  частично агонизируют с улучшением нейропротективной или нейрорепаративной функции по сравнению с полным агонистом  $A_3R$ .

22. Способ по любому из пп.1-3 или 16-18, отличающийся тем, что период восстановления после ишемии сердца или инфаркта миокарда сокращается по сравнению с пациентом, не получавшим лечения.

23. Способ по любому из пп.1-3 или 16-18, отличающийся тем, что указанный агонист представляет собой частичный агонист  $A_3R$  с улучшенной кардиопротективной функцией по сравнению с полным агонистом  $A_3R$ .

24. Способ лечения повреждения, заболевания или состояния, выбранного из:

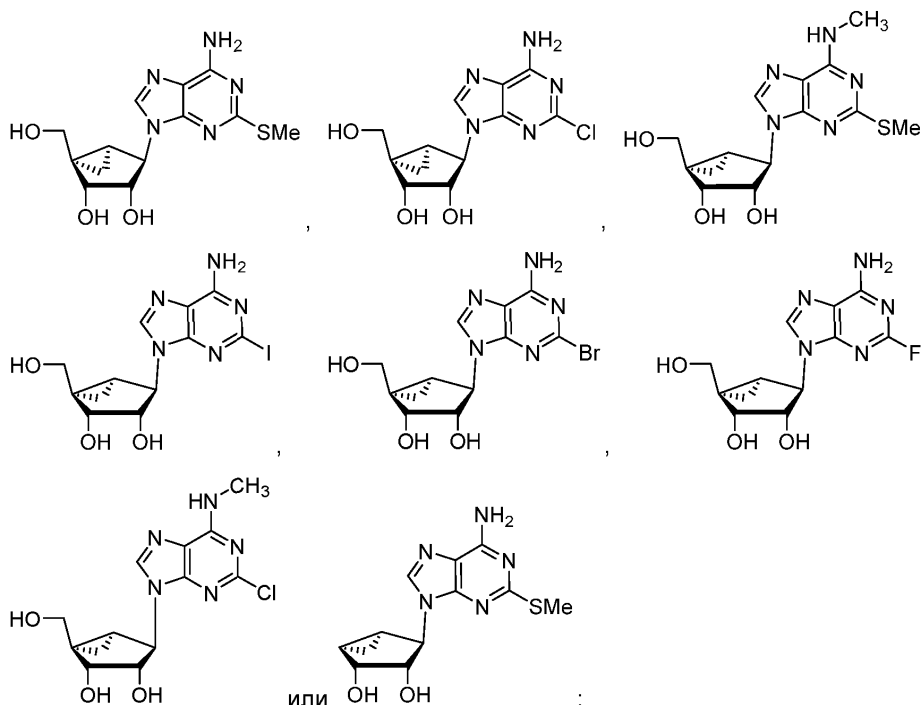
(i) состояния, связанного с повреждением головного мозга или нейродегенеративным состоянием, выбранного из эпилепсии, мигрени, депрессии, изменения настроения или поведения, деменции, неустойчивости поведения, суицидальности, тремора, потери координации движений, глухоты, нарушения речи, сухости глаз, гипомимии, дефицита внимания, потери памяти, когнитивных затруднений или на-



рушений познавательной способности, нарушения функций ЦНС, нарушения обучения, вертиго, дизартрии, дисфагии, нарушения зрения и дезориентации; и

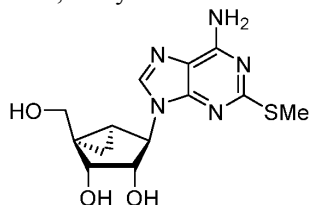
(ii) снятия боли, боли, опосредованной ЦНС, невропатической боли, воспалительной боли или острой боли;

включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества агониста  $A_3$  аденозинового рецептора ( $A_3R$ ); где указанный агонист представляет собой:



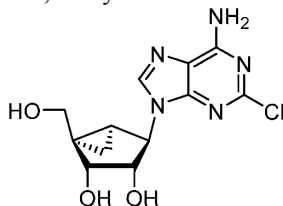
или фармацевтически приемлемую соль указанного соединения.

25. Способ по п.24, отличающийся тем, что указанный агонист представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

26. Способ по п.24, отличающийся тем, что указанный агонист представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

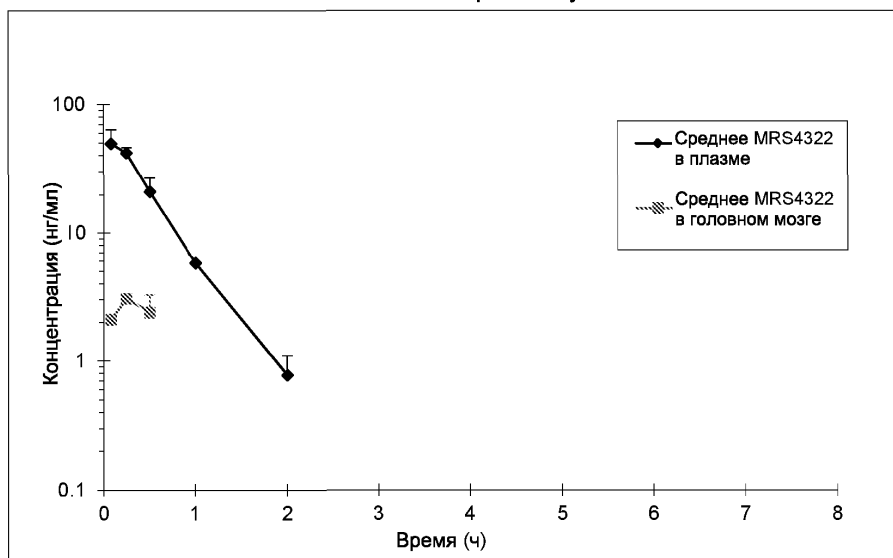
27. Способ по любому из пп.24-26, отличающийся тем, что указанный способ у указанного пациента усиливает нейропротекцию или нейрорепарацию по сравнению с пациентом, не получавшим лечение.

28. Способ по любому из пп.24-27, отличающийся тем, что указанное повреждение, заболевание или состояние представляет собой состояние, связанное с повреждением головного мозга или нейродегенеративное заболевание, выбранное из деменции, неустойчивости поведения, суицидальности, тремора, потери координации движений, нарушения речи, потери памяти, когнитивных затруднений или нарушений познавательной способности, нарушения обучения и дезориентации.

29. Способ по любому из пп.1-28, отличающийся тем, что указанный агонист или его фармацевтически приемлемую соль вводят перорально, внутривенно или парентерально.

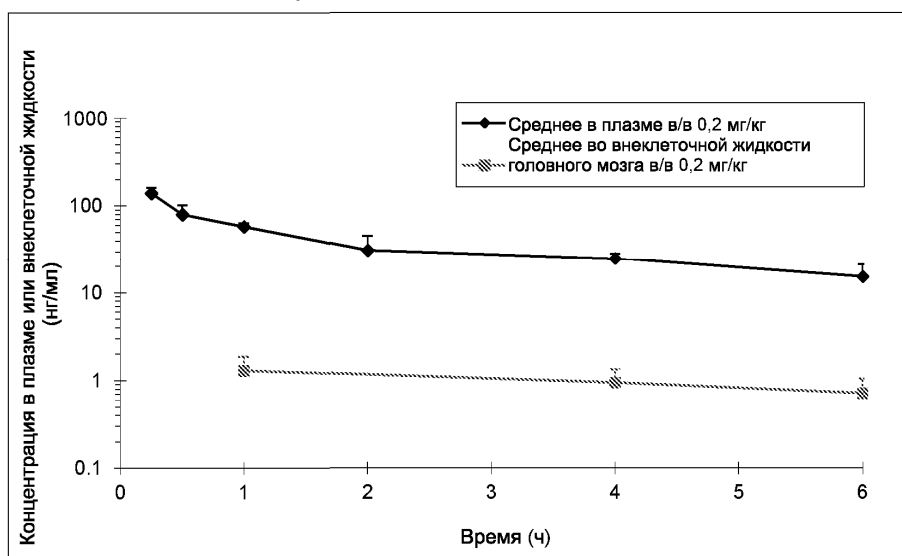
30. Способ по любому из пп.1-29, отличающийся тем, что несвязанная фракция в плазме указанного агониста или его фармацевтически приемлемой соли составляет по меньшей мере примерно 0,07 или несвязанная фракция в мозге указанного агониста или его фармацевтически приемлемой соли составляет по меньшей мере 0,08, или и то, и другое.

Профили концентрации MRS4322 в плазме и в головном мозге в зависимости от времени у мышей

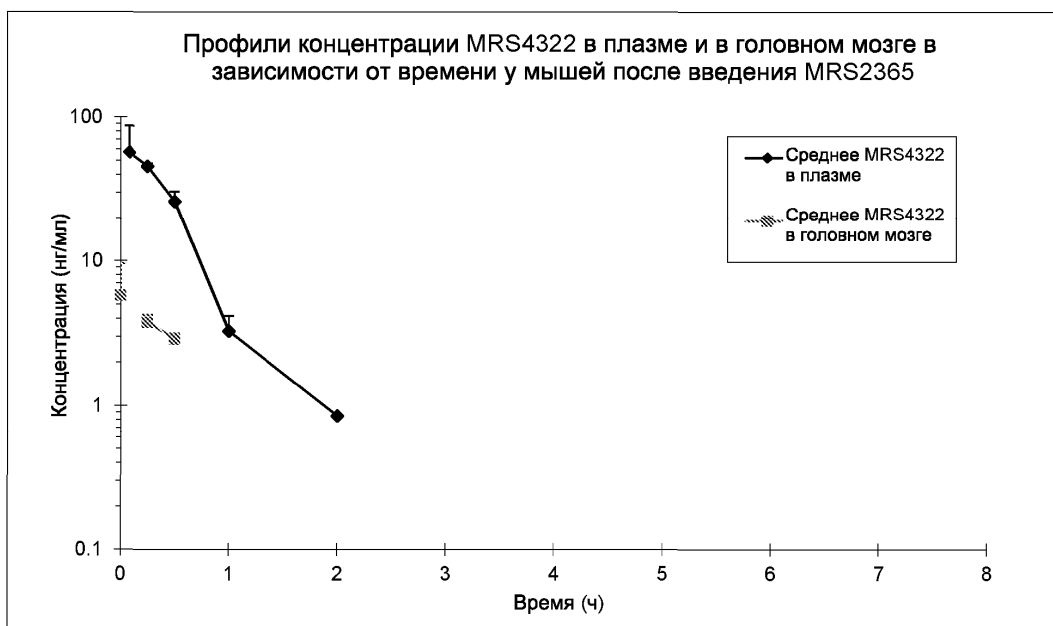


Фиг. 1А

Профили концентрации MRS4322 в плазме и в головном мозге в зависимости от времени у новорожденных поросят

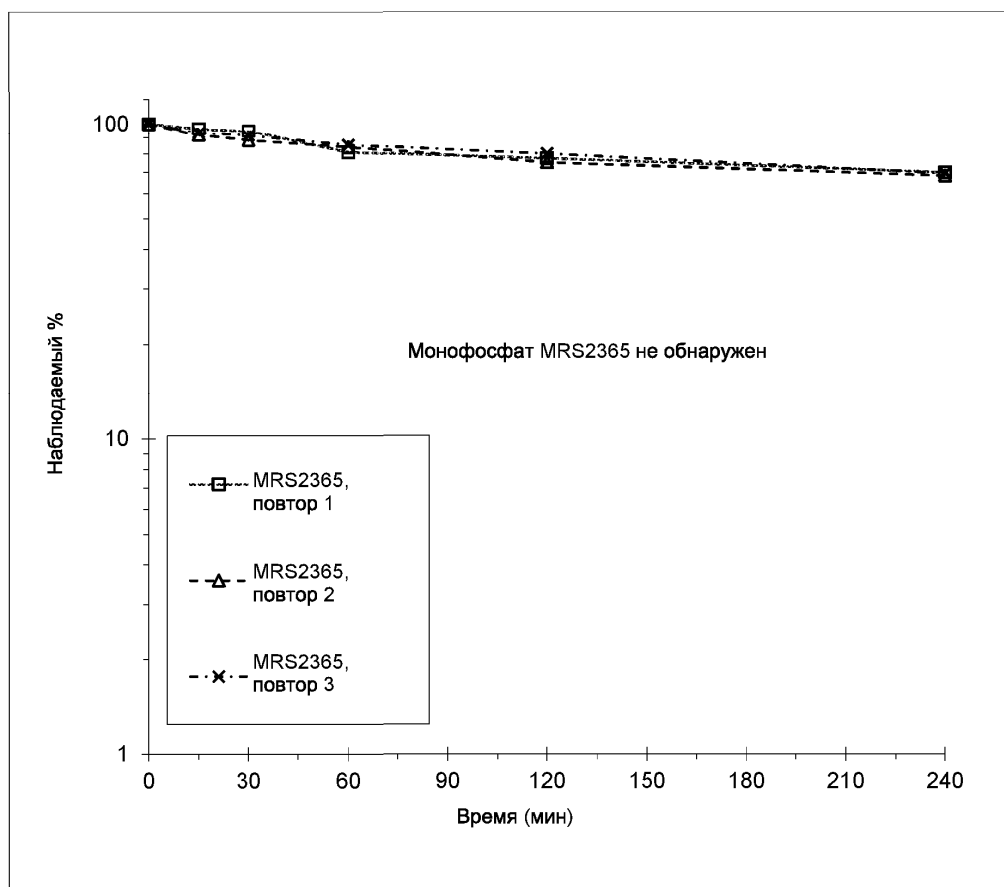


Фиг. 1В

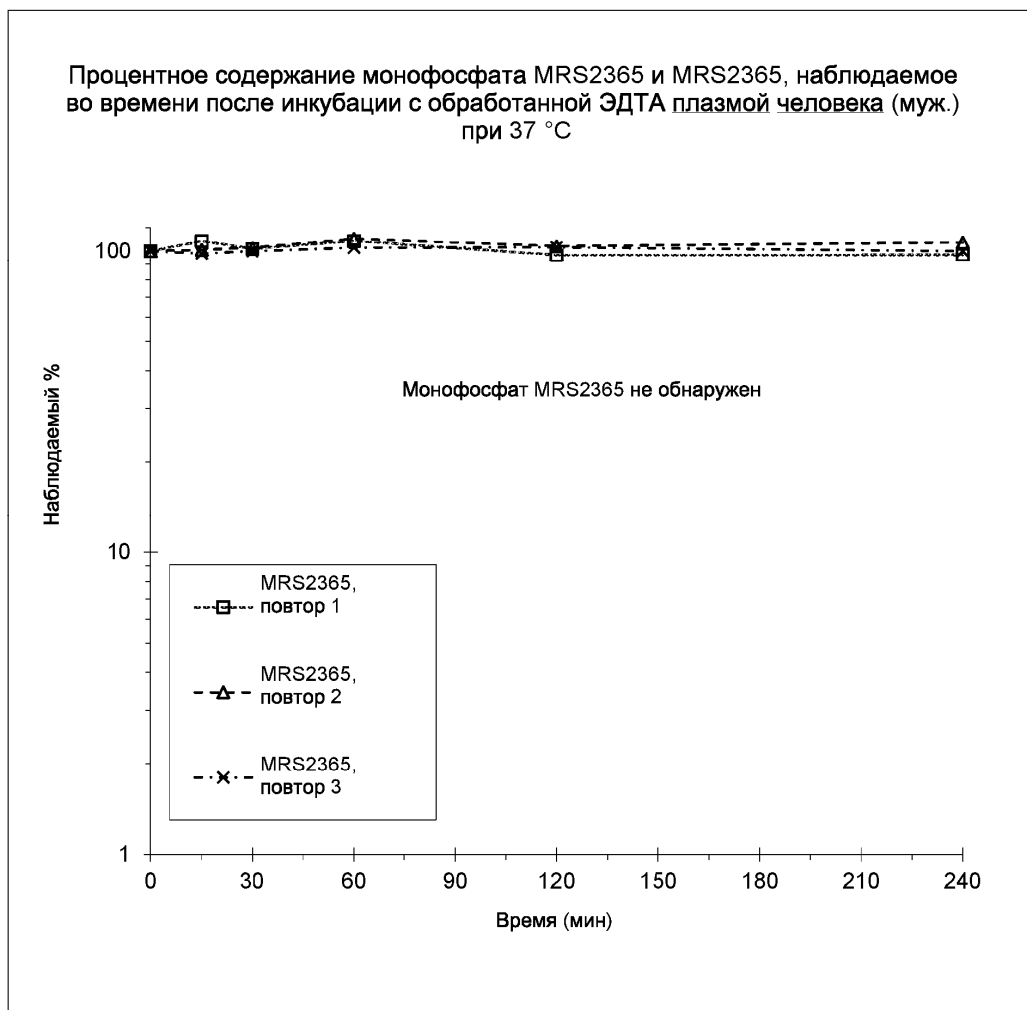


Фиг. 2

Процентное содержание монофосфата MRS2365 и MRS2365, наблюдаемое во времени после инкубации с обработанной ЭДТА плазмой самцов мыши CD-1 при 37 °С

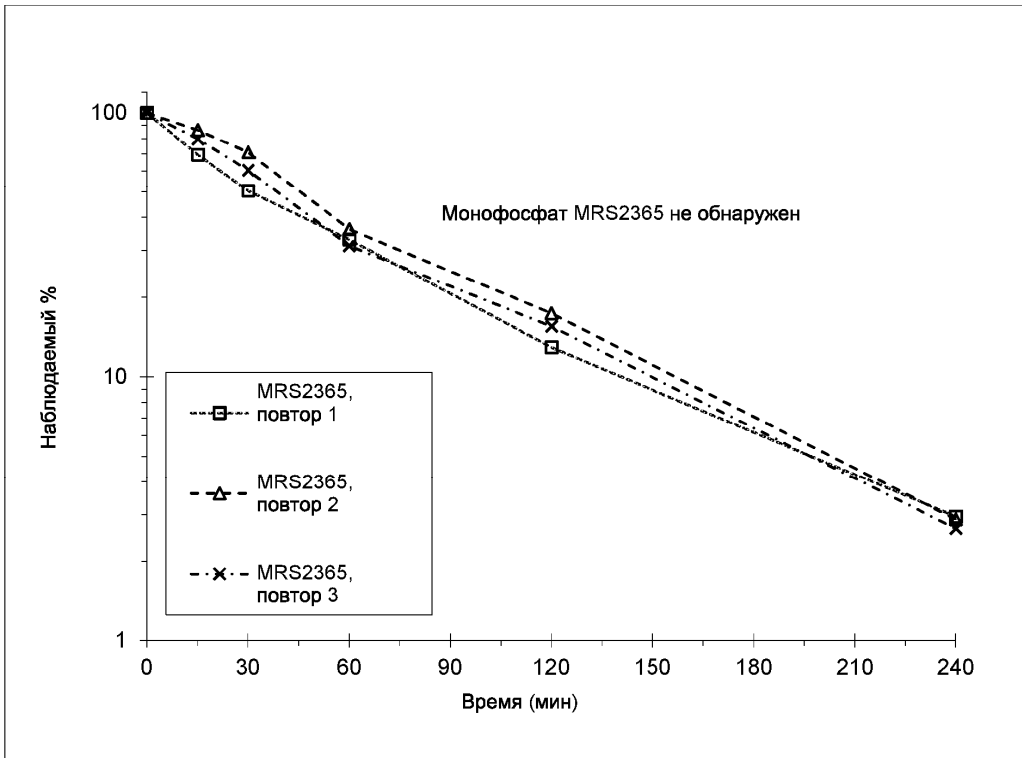


Фиг. 3

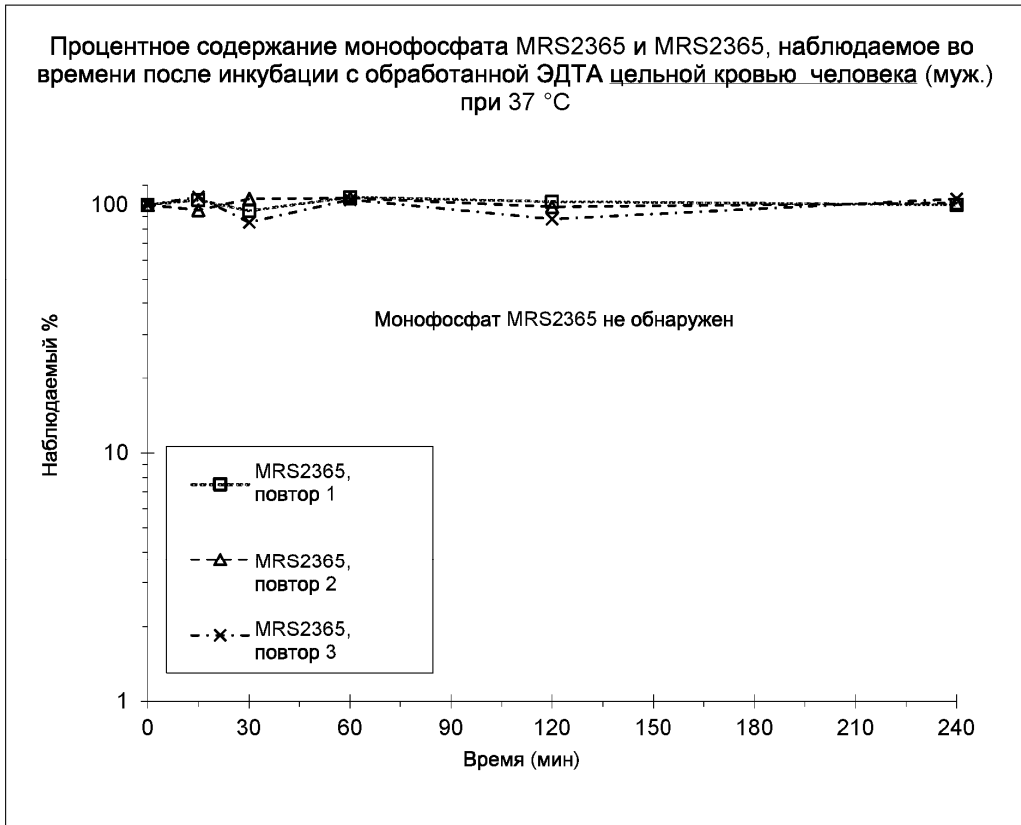


Фиг. 4

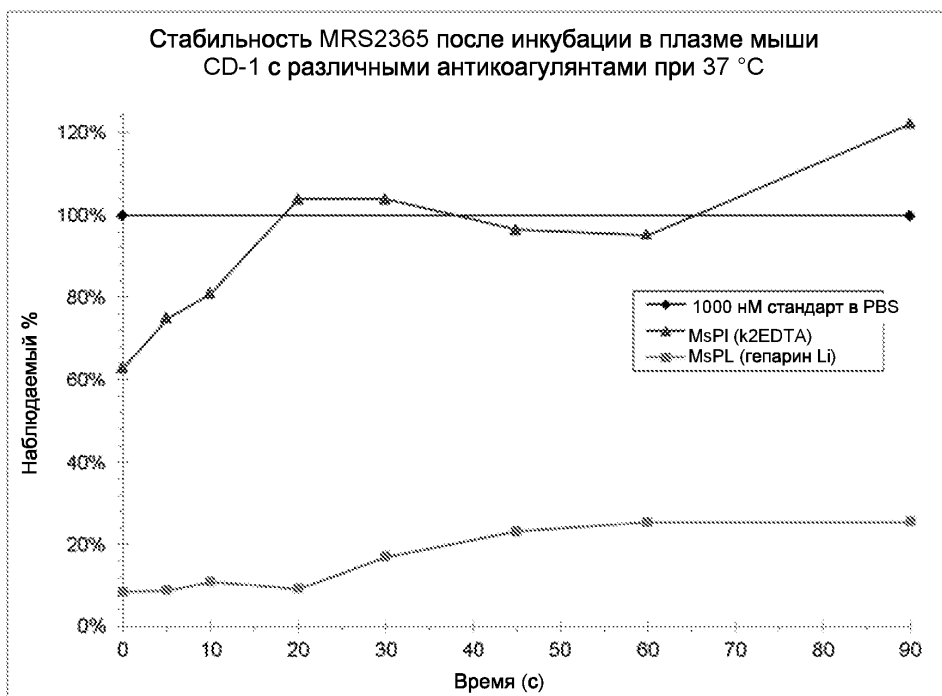
Процентное содержание монофосфата MRS2365 и MRS2365, наблюдаемое во времени после инкубации с обработанной ЭДТА цельной кровью самцов мыши CD-1 при 37 °С



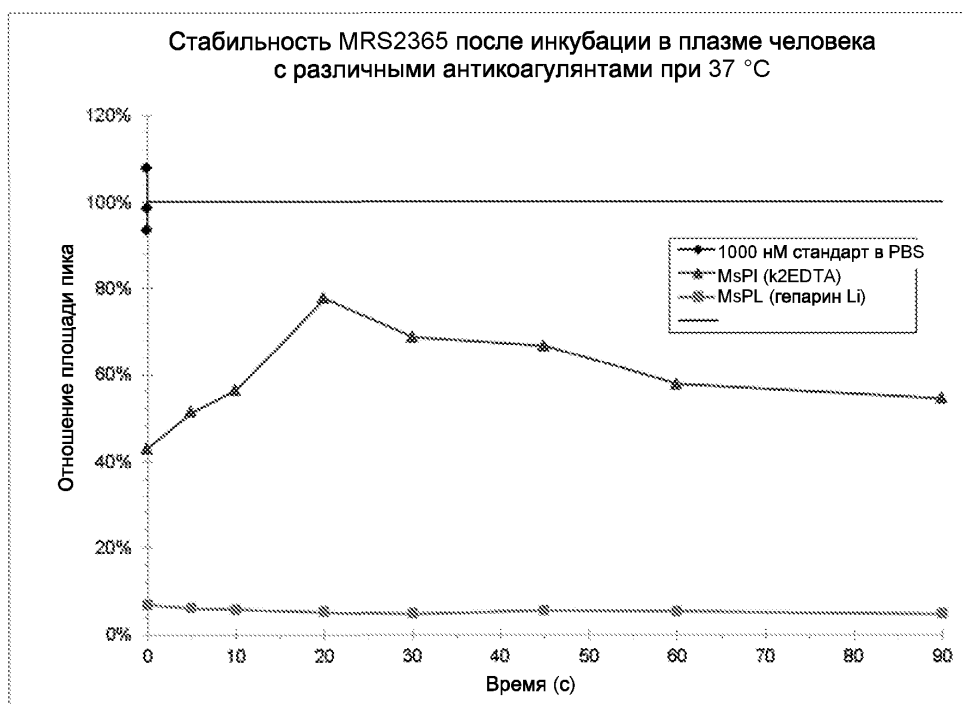
Фиг. 5



Фиг. 6

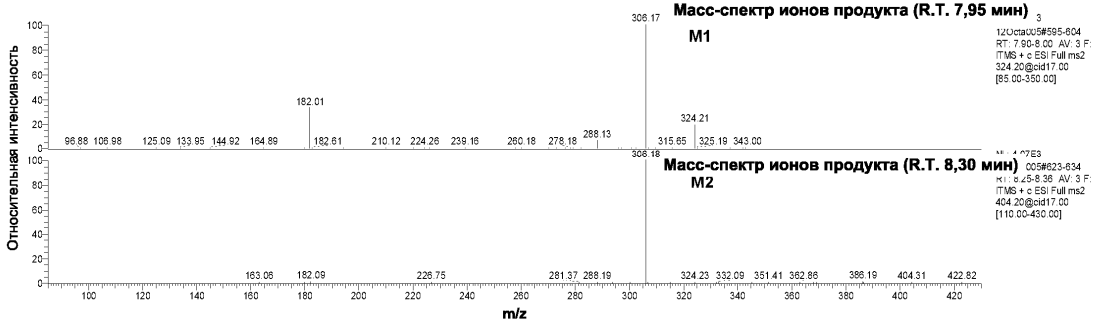
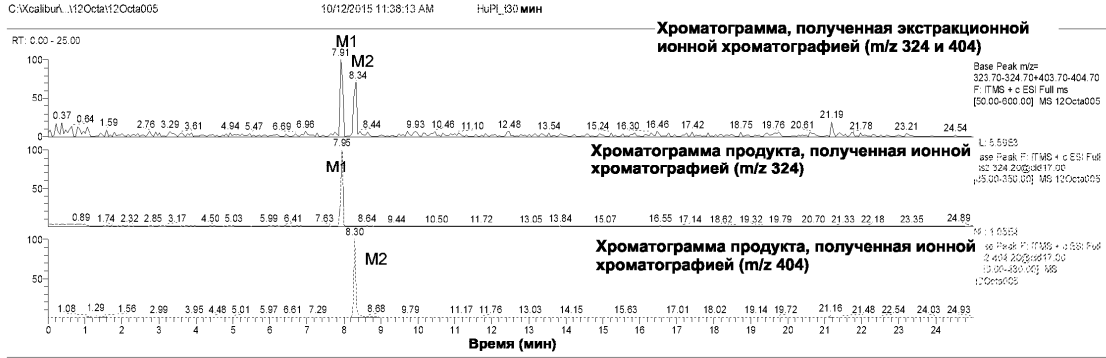


Фиг. 7

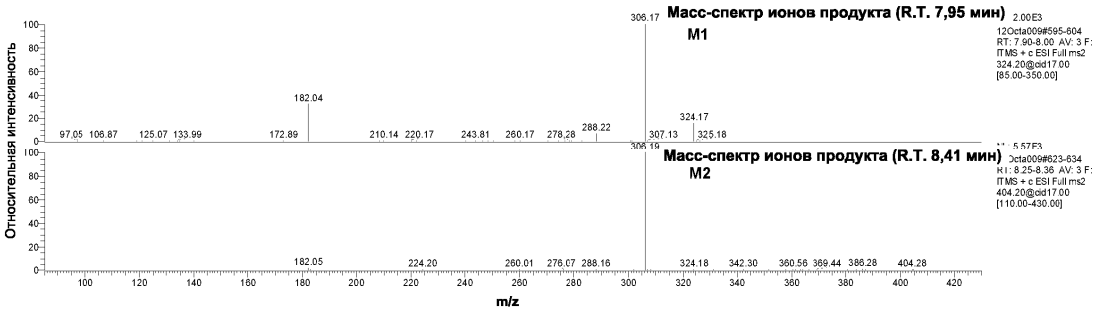
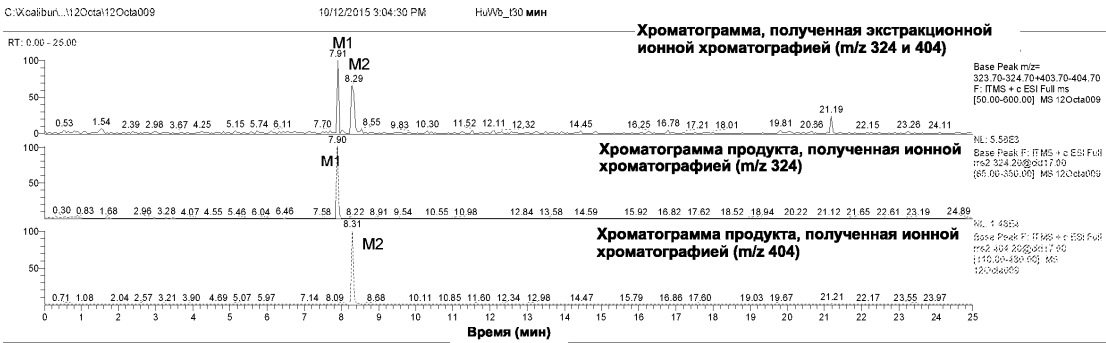


Фиг. 8

047947

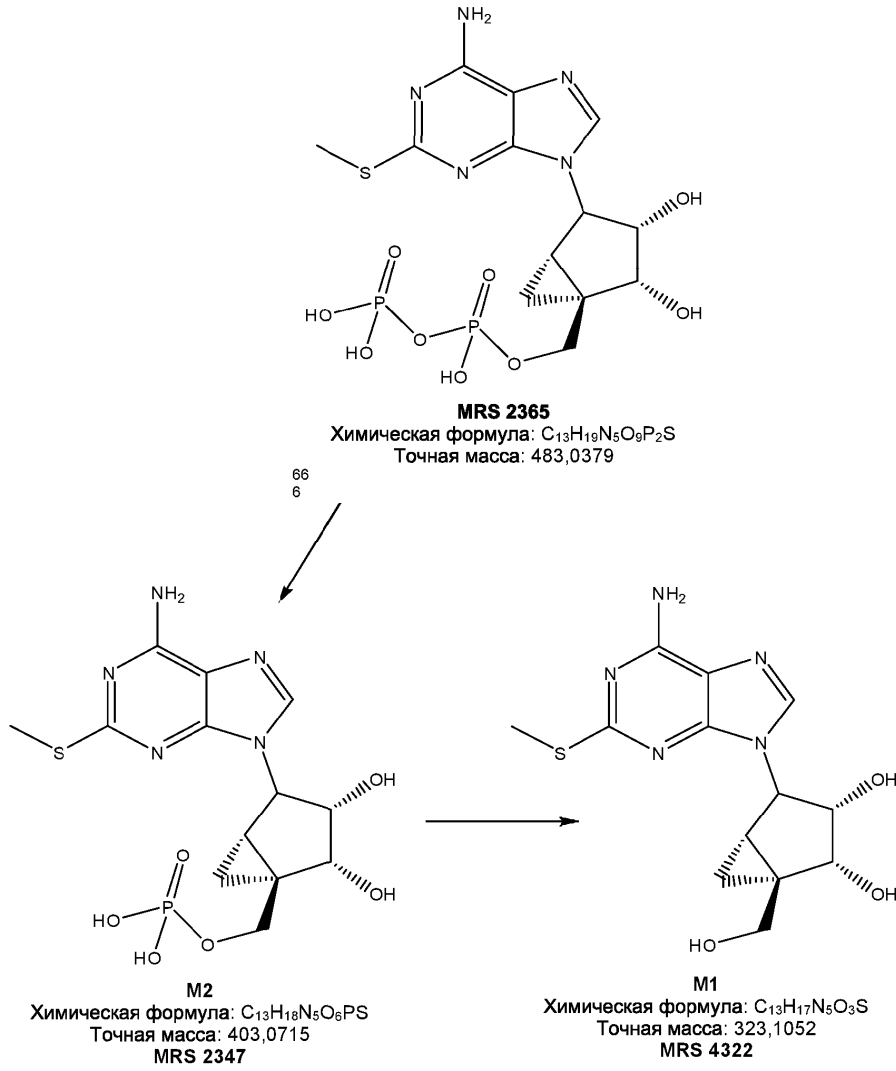


Фиг. 9

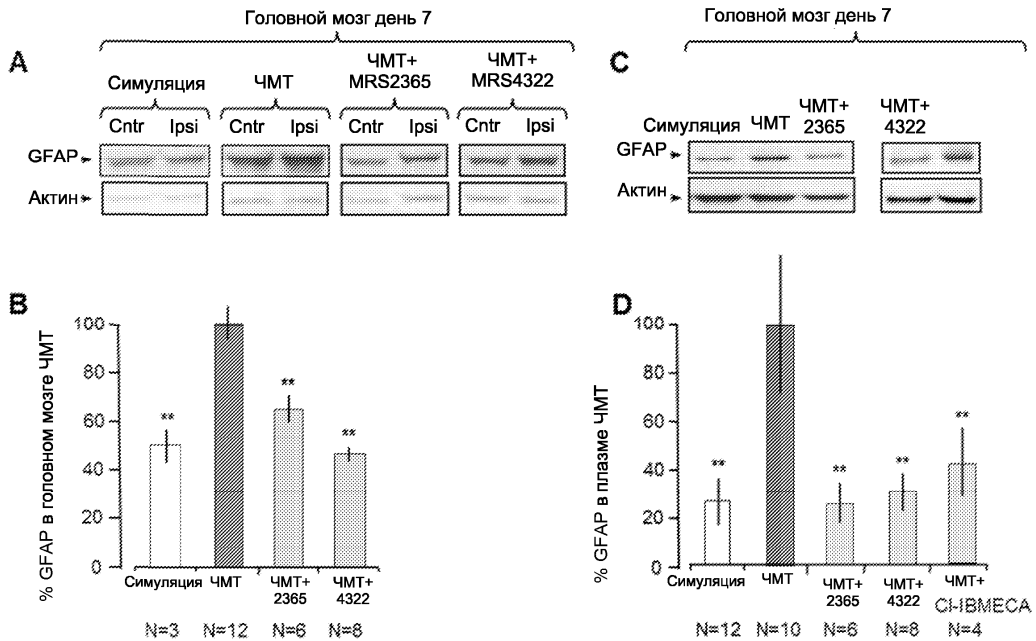


Фиг. 10

047947

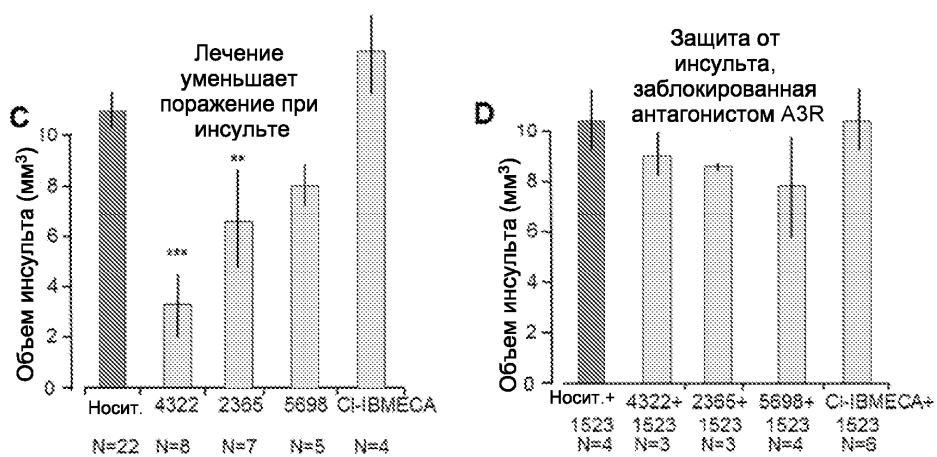
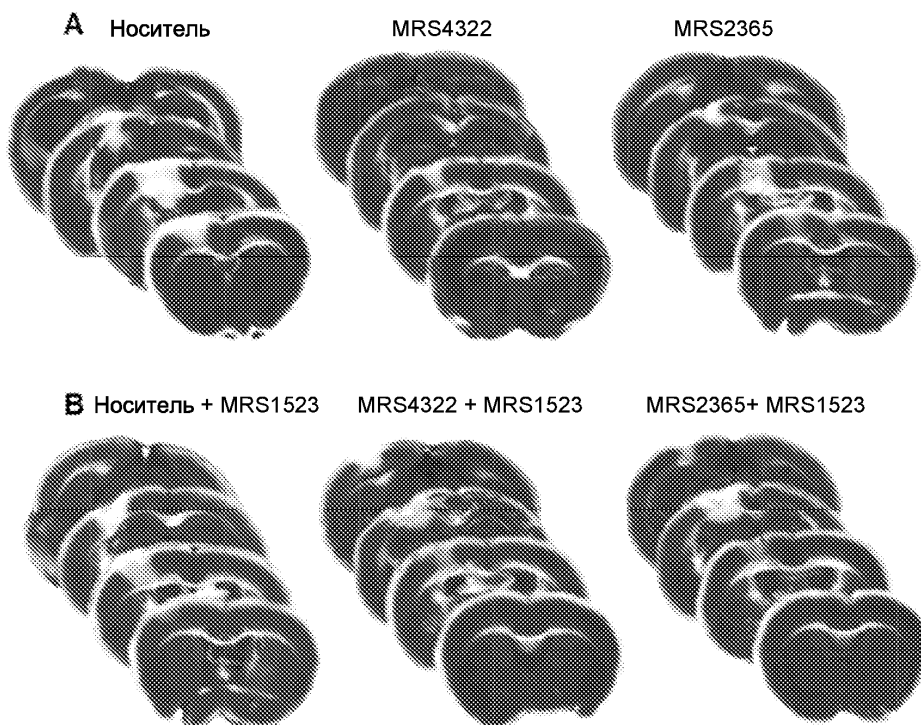


Фиг. 11

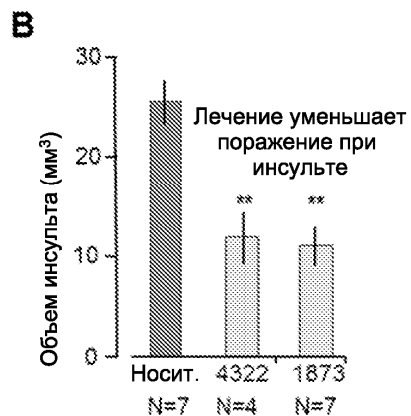
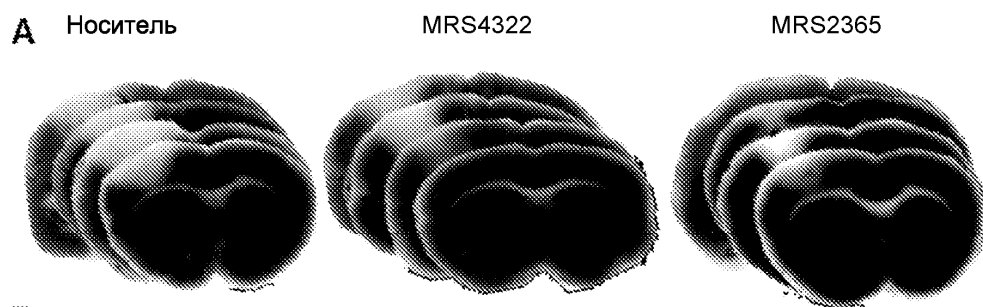


Фиг. 12

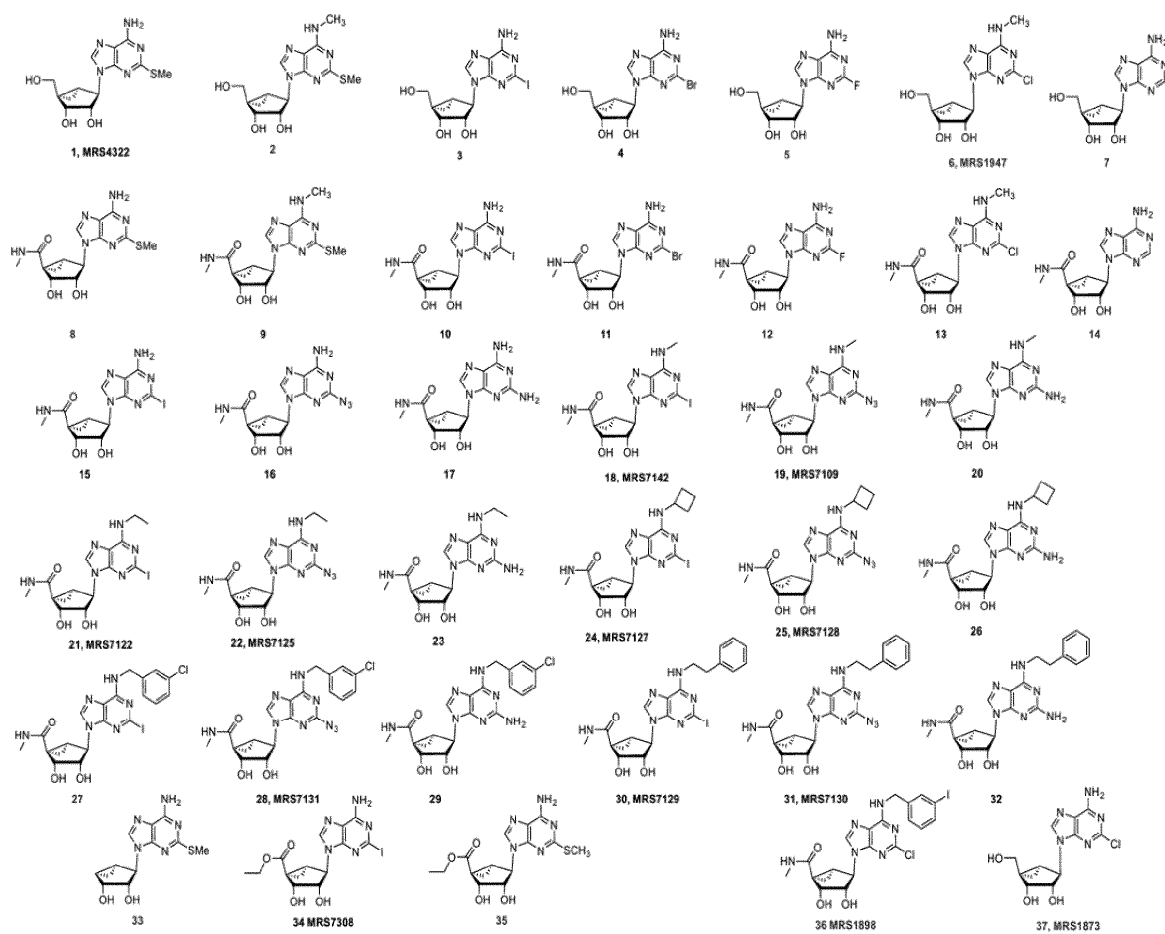




Фиг. 13

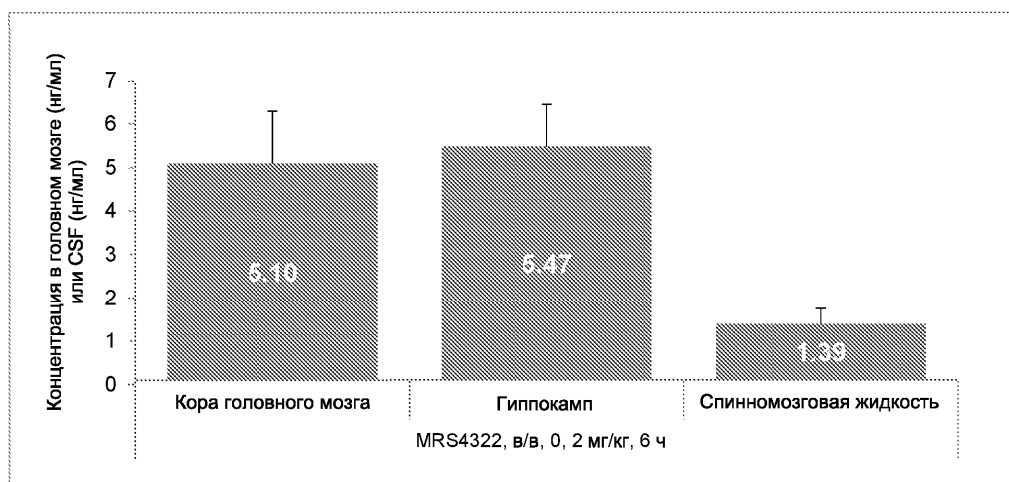


Фиг. 14



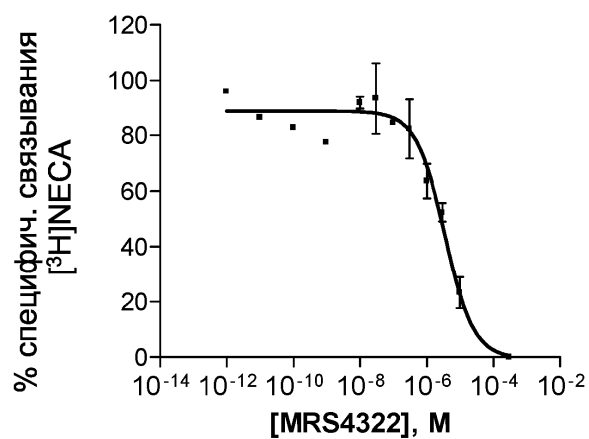
Фиг. 15

Профили зависимости концентрации MRS4322 от времени в мозге и спинномозговой жидкости новорожденных поросят после внутривенного введения



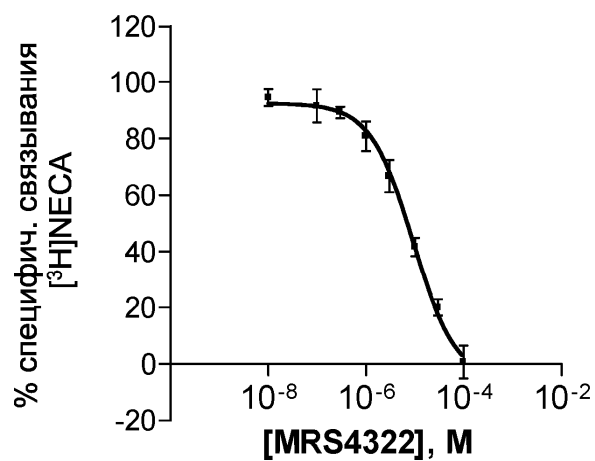
Фиг. 16

Эксперименты по конкурентному связыванию MRS4322 на рецепторах A3 человека



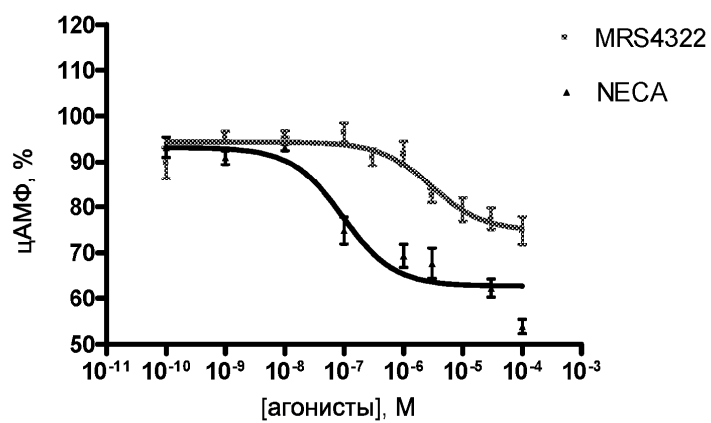
Фиг. 17

Эксперименты по конкурентному связыванию MRS4322 на рецепторах A3 мыши



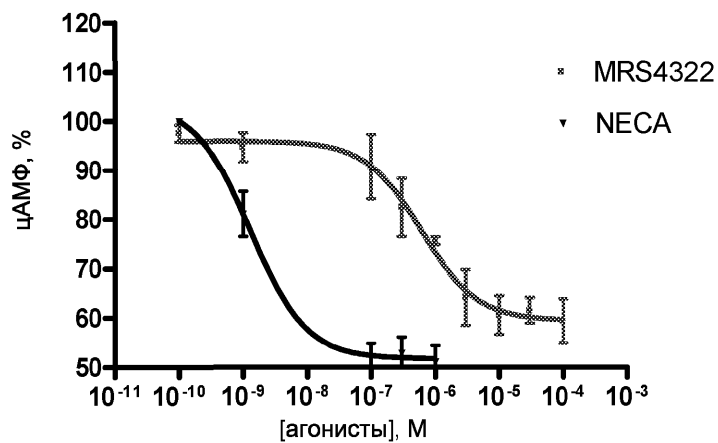
Фиг. 18

Эксперименты по аккумуляции цАМФ для MRS4322 и NECA на рецепторах A3 человека



Фиг. 19

Эксперименты по аккумуляции цАМФ для MRS4322 и NECA на рецепторах A3  
мышь



Фиг. 20



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2