

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **048112**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.25

(21) Номер заявки
202291555

(22) Дата подачи заявки
2020.12.11

(51) Int. Cl. *A61K 31/453* (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(54) **СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА**(31) **2024431**(32) **2019.12.11**(33) **NL**(43) **2022.08.24**(86) **PCT/NL2020/050782**(87) **WO 2021/118359 2021.06.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СУЛФАТЕК Б.В.;
РЕЙКСИОНИВЕРСИТЕЙТ
ГРОНИНГЕН (NL)

(72) Изобретатель:

Хеннинг Роберт Хенк, Ван Дер Граф
Адрианус Корнелис, Креннинг Гейдо,
Сварт Даниел Хенри, Де Вей Местдаг
Кристина Франсуаза, Вогелар Питер
Корнелис (NL)

(74) Представитель:

Нагорных И.М. (RU)

(56) WO-A1-2014098586
WO-A1-2014011047
WO-A1-2017060432
WO-A1-2019101826
WO-A2-2009061744

PEI CAI ET AL.: "Rational Design and Multibiological Profiling of Novel Donepezil-Troxolone Hybrids against Alzheimer's Disease, with Cholinergic, Antioxidant, Neuroprotective, and Cognition Enhancing Properties", ACS CHEMICAL NEUROSCIENCE, vol. 8, no. 11, 25 August 2017 (2017-08-25), pages 2496-2511, XP055705017, US, ISSN: 1948-7193, DOI: 10.1021/acschemneuro.7b00257, abstract

WO-A2-0243666

SUNG SYUAN ET AL.: "Early vitamin E supplementation in young but not aged mice reduces Abeta levels and amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease", FASEB JOURNAL, vol. 18, no. 2, 4 December 2003 (2003-12-04), pages 323-325, XP055781871, ISSN: 0892-6638, DOI: 10.1096/fj.03-0961fje, page 2, paragraph 3 page 4, last paragraph page 5, paragraph 3

(57) Изобретение относится к применению S-(6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-ил)(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)метанон (SUL-138) или его фармацевтически приемлемой соли для улучшения функции памяти и/или уменьшения количества бляшек у пациента с болезнью Альцгеймера. Технический результат, достигаемый настоящим изобретением, состоит в улучшении функции памяти и уменьшении образования бета-бляшек у пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера.

B1**048112****048112****B1**

I. Область техники

Настоящее изобретение относится к соединениям для лечения болезни Альцгеймера. Настоящее изобретение также относится к соединениям хроманола и их производным для улучшения функции памяти.

II. Описание предшествующего уровня техники

Болезнь Альцгеймера является прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием и основной причиной деменции у пожилых людей.

В EP 2994160 B1 описан способ лечения болезни Альцгеймера у пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера средней степени тяжести, и/или у пациентов-носителей аллеля ApoE4 путем введения смешанного иммуноглобулина G.

В EP 2892563 B1 описаны способы лечения болезни Альцгеймера в качестве вспомогательной терапии при лечении с помощью ацетилхолинэстеразы, включающие введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективной суточной дозы N-(2-(6-фтор-1H-индол-3-ил)этил)-3-(2,2,3,3-тетрафторпропокси)бензиламина или его фармацевтически приемлемой соли, при этом эффективная суточная доза, вводимая пациенту, составляет от около 30 до около 60 мг.

В EP 2937085 B1 описано, что комбинация 6-[4-(1-циклогексил-1-тетразол-5,5-ил)бутокси]-3,4-дигидрокарбостирила (цилостазола) или его соли и донепезила или его соли оказывает синергетическое действие при лечении болезни Альцгеймера.

В WO 2002/043666 было высказано предположение, что применение антиоксидантов может предотвратить или уменьшить ухудшение умственных способностей. Хотя антиоксиданты действительно могут снижать окислительную нагрузку в митохондриях, явного эффекта при лечении болезни Альцгеймера не обнаружено.

Cai et al. в ACS Chemical Neuroscience (2017), 8:2496-2511 описывают лекарственные препараты на основе донепезила, содержащего заместитель в виде фрагмента тролокса (Trolox), предложенные для применения при лечении болезни Альцгеймера. Несколько тестов *in vitro* свидетельствуют об определенной активности в отношении некоторых биомаркеров болезни Альцгеймера.

Бета-амилоид (A β или Abeta) обозначает пептиды из 36-43 аминокислот, которые являются основным компонентом амилоидных бляшек, обнаруживаемых в головном мозге людей с болезнью Альцгеймера.

Пептиды образуются из белка-предшественника амилоида (APP), который расщепляется под действием бета-секретазы и гамма-секретазы с образованием A β . Молекулы A β могут агрегировать с образованием гибких растворимых олигомеров, которые могут существовать в нескольких формах. В настоящее время считается, что некоторые неправильно свернутые олигомеры (известные как "затравки") могут вынуждать другие молекулы A β также принимать неправильно свернутую олигомерную форму, что вызывает цепную реакцию, приводящую к образованию бляшек. Растворимые олигомеры токсичны для нервных клеток, и из растворимых олигомеров образуются бляшки.

По-прежнему существует потребность в новых соединениях для лечения болезни Альцгеймера и родственных заболеваний, связанных с ухудшением митохондриальной функции и здоровья, в частности в соединениях, которые имеют меньше побочных эффектов или предпочтительно вообще не имеют побочных эффектов в диапазоне дозировок такого соединения.

Задачей настоящего изобретения является обеспечение соединений для лечения болезни Альцгеймера.

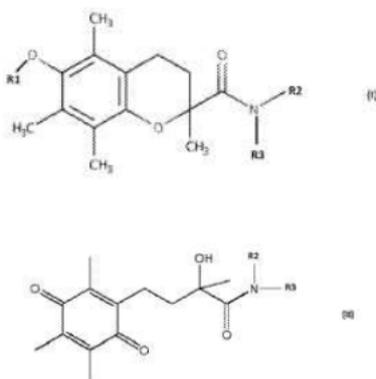
Еще одной задачей настоящего изобретения является обеспечение соединений для улучшения функции памяти.

Дополнительной задачей настоящего изобретения является обеспечение соединений для уменьшения образования бета-бляшек у пациента, страдающего болезнью Альцгеймера.

III. Сущность изобретения

Одна или более из перечисленных выше задач решена путем обеспечения определенных соединений хроманола, хинона или гидрохинона для одного или более из указанных способов лечения.

Перечисленные выше задачи решены с помощью настоящего изобретения путем обеспечения соединений формулы (I), (II), аналога гидрохинона формулы (II) или его фармацевтически приемлемой соли для применения при лечении болезни Альцгеймера или для улучшения функции памяти и/или для уменьшения количества бляшек у пациента с болезнью Альцгеймера:



где R1 представляет собой водород или фрагмент пролекарства, который может удаляться в живой ткани,

при этом либо R2 и R3 вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют насыщенное или ненасыщенное, неароматическое, необязательно замещенное 5-8-членное кольцо, содержащее от одного до четырех атомов N, O или S, где R2 и R3 вместе содержат от 3 до 12 атомов углерода;

либо R2 представляет собой атом водорода или алкильную группу, содержащую от 1 до 6 атомов углерода, и R3 представляет собой алкильную группу, необязательно содержащую в качестве заместителя азот или кислород, при этом указанная алкильная группа содержит от 3 до 12 атомов углерода, где алкильная группа в R3 включает одну или более неароматических циклических структур и может содержать линейные и/или разветвленные группы и одну или более этиленовых двойных связей.

Для целей настоящего изобретения соединение формулы (II) включает аналог гидрогенизированного хинона (т.е. гидрохинон), хотя производное хинона является предпочтительным с точки зрения стабильности.

Согласно предпочтительному варианту реализации азот может представлять собой амин, четвертичный амин, гуанидин или имин, и кислород представляет собой гидроксил, карбонил или карбоновую кислоту и/или кислород и азот вместе могут образовывать амидные, мочевиные или карбаматные группы.

Согласно предпочтительному варианту реализации R1 в формуле (I) представляет собой водород или вместе с кислородом в положении 6 образует сложнэфирную группу, содержащую от 2 до 6 атомов углерода.

Согласно предпочтительному варианту реализации любого из соединений формулы (I) или формулы (II) R2 и R3 вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют насыщенное кольцо, включающее дополнительный атом N, при этом указанное кольцо является незамещенным или содержит в качестве заместителя спирт или алканольную группу, содержащую от 1 до 4 атомов углерода, такую как этилол.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации R2 представляет собой атом водорода и R3 включает насыщенную циклическую структуру, содержащую от 4 до 7 атомов углерода и содержащую один атом азота, при этом указанное кольцо является незамещенным или содержит в качестве заместителя спирт или алканольную группу, содержащую от 1 до 4 атома углерода, такую как этилол.

Согласно еще одному предпочтительному варианту реализации предложенное соединение представляет собой (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-ил)(пиперазин-1-ил)метанон (SUL-121), гидрохлорид ((S)-6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметил-N-((R)-пиперидин-3-ил)хроман-2-карбоксамид) (SUL-13) или (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-ил)(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)метанон (SUL-109).

Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации предложенное соединение представляет собой S-энантиомер SUL-109, а именно S-(6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-ил)(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)метанон (SUL-138).

Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения молекулярная масса соединения формулы (I) или формулы (II) составляет менее 500 Да.

Производные тролокса как таковые описаны, например, в WO 2014/098586, WO 2014/011047 и WO 2017/060432. Однако функция памяти или образование бляшек не исследованы, как и не описан другой тип испытания *in vivo* или *in vitro*, непосредственно относящийся к лечению болезни Альцгеймера.

В WO 2019/101826 было высказано предположение, что некоторые соединения, содержащие фрагмент тролокса, могут действовать как ингибитор MPGES (микросомальная простагландин Е-синтаза), который, как полагают, является полезным при лечении воспалительных заболеваний. В WO 2019/101826 было высказано предположение, что болезнь Альцгеймера может действовать посредством MPGES, однако данное исследование не обнаружило каких-либо различий в экспрессии у мышей дикого типа по сравнению с мышами APP/PS1 (презенилин-1), что указывает на то, что MPGES не имеет отношения к болезни Альцгеймера.

Функция памяти и образование бляшек, вызванное полимеризацией амилоида-Р, считаются основ-

ными проблемами при болезни Альцгеймера. Несмотря на то, что некоторые антиоксиданты возможно снижают основные механизмы окисления, не было предоставлено никаких доказательств, что функцию памяти можно действительно улучшить. Настоящие результаты показывают, что определенные производные тролокса могут представлять собой новый важный способ лечения болезни Альцгеймера.

IV. Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показано, как длительное лечение с помощью SUL-138 усиливает память (замирание, %) у мышей дикого типа (WT) и мышей APP.

На фиг. 2 показано, как SUL-138 увеличивает поддержание LTP как у мышей WT, так и у мышей APP.

На фиг. 3 показано, что лечение с помощью SUL-138 уменьшает количество и размер бляшек у мышей APP/PS1.

V. Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение решает одну или более из перечисленных выше задач путем обеспечения соединений формулы (I) или (II), как показано выше, или их фармацевтически приемлемых солей для применения при лечении болезни Альцгеймера или для улучшения функции памяти и/или для уменьшения количества бляшек у пациента, страдающего болезнью Альцгеймера.

Функция памяти предпочтительно улучшается, и в то же время снижается образование бляшек, что, тем самым, позволяет еще больше улучшить лечение болезни Альцгеймера.

Поскольку улучшение функции памяти не считается терапевтическим лечением, в настоящем изобретении также предложено применение указанных соединений согласно определению для улучшения функции памяти у млекопитающего. Млекопитающее предпочтительно представляет собой человека.

R1 может представлять собой заместитель, который легко удаляется в организме человека, так что предложенное соединение представляет собой пролекарство. R1 может представлять собой, например, производное аминокислоты или производное сложного эфира и обычно имеет молекулярную массу менее 100 Да.

Согласно предпочтительному варианту реализации R1 в формуле (I) представляет собой водород или вместе с кислородом в положении 6 образует сложноэфирную группу, содержащую от 2 до 6 атомов углерода. Сложный эфир может содержать одну или более простых эфирных или спиртовых групп. Подходящими сложными эфирами являются ацетат, бутират, 3-гидроксибутират и т.п.

Согласно предпочтительному варианту реализации любого из соединений формулы (I) или формулы (II) R2 и R3 вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют насыщенное кольцо, содержащее от 3 до 6 атомов углерода и включающее один дополнительный атом N, который может содержать в качестве заместителя от 1 до 4 атомов углерода, которые могут содержать кислород, карбоксильную группу или аминогруппу.

Более предпочтительно, R2 и R3 вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют 5-7-членное кольцо, содержащее одну дополнительную аминогруппу, при этом указанное кольцо необязательно содержит в качестве заместителя метил, этил или спирт, содержащий в качестве заместителя метил или этил.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации R2 представляет собой атом водорода и R3 включает циклическую структуру, содержащую от 3 до 6 атомов углерода и содержащую один атом азота.

Более предпочтительно R2 представляет собой атом водорода, и R3 включает 5-7-членное кольцо, содержащее одну дополнительную аминогруппу, при этом указанное кольцо присоединено к азоту амида, и при этом указанное кольцо необязательно содержит в качестве заместителя метил, этил или спирт, содержащий в качестве заместителя метил или этил.

В любом случае указанное кольцо (циклическая структура, образованная R2 и R3 или только R3) может быть незамещенной или содержать в качестве заместителя алкил, содержащий от 1 до 4 атомов углерода, спиртовую или алканольную группу, содержащую от 1 до 4 атомов углерода, такую как этилол.

Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения молекулярная масса соединения формулы (I) или формулы (II) составляет менее 500 Да.

Некоторые соединения хроманола были описаны в WO 2014/098586. Указанные подробно описанные соединения имеют сокращения, относящиеся к SUL-XXX (где XXX представляет собой двух- или трехзначное число). Многие из таких соединений представляют собой рацемические смеси, хотя также были исследованы и некоторые энантиомеры. Подходящие способы получения соединений хроманола согласно настоящему изобретению описаны в WO 2014/098586 или WO 2014/011047.

В WO 2017060432 A1 описаны амидные производные 2-гидрокси-2-метил-4-(3,5,6-триметил-1,4-бензохинон-2-ил)бутановой кислоты и способы получения таких соединений.

Гидрогенизированные производные хинона можно легко получить путем гидрирования структуры хинона.

Согласно еще одному предпочтительному варианту реализации предложенное соединение представляет собой (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-ил)(пиперазин-1-ил)метанон (SUL-121), гидро-

хлорид ((S)-6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметил-N-((R)-пиперидин-3-ил)хроман-2-карбоксамид (SUL-13) или (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-ил)(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)метанон (SUL-109).

Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации предложенное соединение представляет собой S-энантиомер SUL-109, а именно S-(6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-ил)(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)метанон (SUL-138).

Противоион в фармацевтически приемлемой соли может представлять собой противоион, известный в данной области техники. Предложенные соединения предпочтительно содержат по меньшей мере один основной азот, амин, который может быть протонирован. Противоион предпочтительно представляет собой галоген, такой как хлорид, сульфат, цитрат, формиат и т.п., наиболее предпочтительно хлорид.

Предложенные соединения являются эффективными в виде рацемической смеси или по существу в чистой энантиомерной форме. Предложенные соединения имеют один или более хиральных центров, обычно один или два.

Предложенное соединение предпочтительно представляет собой по существу энантиомерно чистое соединение. По существу энантиомерно чистое соответствует энантиомерному избытку, составляющему около 95% или более, более предпочтительно энантиомерному избытку, составляющему около 98%, и наиболее предпочтительно энантиомерному избытку, составляющему около 99% или более. Кроме того, в случае, если предложенное соединение содержит более одного хирального центра, применяют указанные количества.

Предложенные соединения предпочтительно используют в эффективных количествах для обеспечения улучшения функции памяти и/или для обеспечения лечения болезни Альцгеймера.

Термин "лечение" включает замедление прогрессирования заболевания и/или облегчение симптомов заболевания.

Обычно эффекты наблюдаются при количествах около 1 мкМ в биологической жидкости организма, но предпочтительно используют более высокие количества. Предпочтительными количествами являются концентрации *in vivo* или *in vitro* около 10 мкМ или выше, более предпочтительно около 20 мкМ или выше. Как правило, концентрация у человека около 200 мкМ или ниже должна быть достаточной и безопасной.

При применении человеком это будет означать - при условии, что объем распределения составляет 30 л, доступность 100% и концентрация около 1 мкМ - дозировку около 10 мг или более. Предпочтительные количества обеспечивают концентрацию около 10 мкМ, для которой подходящей будет доза около 100 мг или более. Следовательно, предпочтительно, подходящими являются лекарственные формы около 20 мг или более, предпочтительно 50 мг или более, предпочтительно 100 мг или более. Как правило, твердые лекарственные формы для перорального применения содержат максимум около 500 мг соединения, предпочтительно около 450 мг или менее, с учетом вспомогательных веществ. При внутривенном введении других жидких форм можно вводить большие количества.

Примеры дозировок, которые можно использовать, представляют собой эффективное количество соединений согласно настоящему изобретению в дозе 0,2 мг/кг или выше, например, предпочтительно в диапазоне от около 1 до около 100 мг/кг, или в диапазоне от около 2 до около 40 мг/кг массы тела, или в диапазоне от около 3 до около 30 мг/кг массы тела, или в диапазоне от около 4 до около 15 мг/кг массы тела. Соединения согласно настоящему изобретению можно вводить в однократной суточной дозе или общую суточную дозу можно вводить в разделенной дозе два, три или четыре раза в сутки.

Соединения, описанные в настоящем документе, можно приготовить в виде фармацевтических композиций путем составления смеси с добавками, такими как фармацевтически или физиологически приемлемые вспомогательные вещества, носители и наполнители.

Подходящие фармацевтически или физиологически приемлемые вспомогательные вещества, носители и наполнители включают эмульгаторы, и модификаторы, и усилители для доставки лекарственных средств, такие как, например, фосфат кальция, стеарат магния, тальк, моносахариды, дисахариды, крахмал, желатин, целлюлоза, метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза натрия, декстроза, гидроксипропил-Р-циклодекстрин, поливинилпирролидон, легкоплавкие воски и т.п., а также комбинации любых двух или более из перечисленных веществ. Другие подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Pub. Co., New Jersey (1991).

Фармацевтическая композиция предпочтительно содержит лекарственную форму в виде однократной дозы, при этом указанная однократная доза представляет собой дозу, достаточную для оказания терапевтического эффекта. Однократная доза может представлять собой дозу, вводимую периодически в процессе лечения или подавления расстройства.

Кроме того, однократная доза может представлять собой дозу, вводимую периодически в процессе лечения для улучшения врожденных когнитивных функций, связанных с памятью.

Соединения согласно настоящему изобретению можно вводить энтерально, перорально, парентерально, сублингвально, путем ингаляции (например, в виде аэрозолей или спреев), ректально или местно в единичных дозированных формах, содержащих обычные нетоксичные фармацевтически или физиологически приемлемые носители, адъюванты и наполнители, по желанию. В настоящем документе термин

"парентеральный" включает подкожные инъекции, внутривенные, внутримышечные, интразальные инъекции или инфузионные методы. Предложенные соединения смешивают с фармацевтически приемлемыми носителями, адьювантами и наполнителями, подходящими для требуемого пути введения.

Пероральное введение является предпочтительным путем введения, и составы, подходящие для перорального введения, представляют собой предпочтительные составы.

Соединения, описанные для применения в настоящем изобретении, можно вводить в твердой форме, в жидкой форме, в форме аэрозоля или в форме таблеток, пилюль, порошковых смесей, капсул, гранул, инъекций, кремов, растворов, суппозиториях, клизм, орошений кишечника, эмульсий, дисперсий, пищевых смесей и в других подходящих формах. Предложенные соединения также можно вводить в липосомных составах.

Препараты для инъекций, например стерильные водные или маслянистые суспензии для инъекций, можно приготовить согласно известному уровню техники с применением подходящих диспергирующих или смачивающих средств и суспендирующих средств. Стерильный препарат для инъекций также может представлять собой стерильный раствор или суспензию для инъекций в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в пропиленгликоле. В число приемлемых наполнителей и растворителей, которые можно использовать, входят вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды обычно используют стерильные нелетучие масла. Для этой цели можно использовать любое мягкое нелетучее масло, в том числе синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, при приготовлении инъекционных лекарственных форм находят применение жирные кислоты, такие как олеиновая кислота.

Суппозитории для ректального введения лекарственного средства можно приготовить путем смешивания лекарственного средства с подходящим нераздражающим вспомогательным веществом, таким как масло какао и полиэтиленгликоли, которые являются твердыми при комнатной температуре, но жидкими при ректальной температуре, и поэтому будут плавиться в прямой кишке и высвобождать лекарственное средство.

Твердые лекарственные формы для перорального введения могут включать капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых лекарственных формах активное соединение может быть смешано с по меньшей мере одним инертным разбавителем, таким как сахароза, лактоза или крахмал. Указанные лекарственные формы могут также содержать дополнительные вещества, отличные от инертных разбавителей, например смазывающие средства, такие как стеарат магния. В случае капсул, таблеток и пилюль лекарственные формы могут также содержать буферные агенты. Кроме того, можно приготовить таблетки и пилюли с энтеросолюбильными покрытиями.

Жидкие лекарственные формы для перорального введения могут включать фармацевтически приемлемые эмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры, содержащие инертные разбавители, обычно используемые в данной области техники, такие как вода. Указанные композиции также могут содержать адьюванты, такие как смачивающие средства, эмульгирующие и суспендирующие средства, циклодекстрины и подсластители, вкусоароматические и ароматизирующие добавки.

Количество активного ингредиента, который можно объединить с материалами-носителями для получения единичной лекарственной формы, будет варьировать в зависимости от хозяина, которому вводят активный ингредиент, и конкретного способа введения. Обычно приготавливают выбранную однократную дозировку, которую вводят для обеспечения определенной конечной концентрации лекарственного средства в крови, тканях, органах или других целевых участках тела. Эффективное количество для конкретной ситуации может быть легко определено с помощью рутинных экспериментов и находится в пределах компетенции и суждения обычного клинициста или специалиста в данной области техники.

Настоящее изобретение будет дополнительно проиллюстрировано с помощью приведенных ниже примеров. В указанных примерах сделана ссылка на графические материалы.

VI. Примеры

Пример 1.

Эффективность соединений согласно настоящему изобретению для лечения болезни Альцгеймера исследовали с помощью двух независимых тестов: тестом на рефлекторную память и тестом, показывающим конфигурацию синаптических связей.

Способы и подробности эксперимента.

Мышиная модель APP/PS1 представляет собой широко применяемую основанную на А-бета модель патологии для болезни Альцгеймера (AD) (1 из 2 основных нейropатологических признаков AD). Такие мыши содержат трансгены человека для APP (шведская мутация) и PSEN1 (мутация L166P), что приводит к патологическому отложению амилоида в головном мозге и нарушениям гиппокамп-зависимой памяти и долговременной потенциации (LTP) начиная с ~3-месячного возраста (3 тоа).

Была исследована эффективность SUL-138 ((6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-ил)(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)метанона) для облегчения/предотвращения общей патологии в модели APP/PS1. Влияние на память исследовали с применением гиппокамп-зависимого контактного теста (выработка условного рефлекса в связи с переживанием чувства страха (FC)), а конфигурацию синаптических связей исследовали посредством электрофизиологических измерений LTP (долговременной потен-

циации). Оба теста показали нарушения в указанной мышшиной модели в стандартных условиях. Кроме того, использовали клетки Phenotyper (Sylics) для исключения того, что SUL-138 вызывает атипичное поведение после длительного перорального приема.

Все мыши дикого типа (WT) и мыши APP/PS1 были разделены на две группы, получавшие либо наполнитель, либо SUL-138 через их пищу. Размер группы составлял 12 животных. Исходя из массы мыши ~30 г, потребления пищи ~5 г/день и требуемого перорального приема 30 мг/день/кг, кормовые гранулы опрыскивали раствором SUL-138 в воде, содержащей 0,0145% этанола, при содержании SUL-138 1 г в 5 кг корма. Пищу в качестве наполнителя приготавливали путем опрыскивания таким же объемом воды, содержащей 0,0145 % этанола.

Перед исследованием мышей подвергали длительному лечению в интервале от 2,5 месяцев (препатология/нарушение памяти) до 6 месяцев (возраст, в котором возникает явная нейропатология и нарушение памяти).

ФС: мышей подвергали воздействию контекста в течение 2 мин, после чего они получали удар током 0,7 мА по лапам. Через 30 с после удара током по лапам мышей возвращали обратно в домашнюю клетку. Через 24 ч мышей помещали в тот же контекст и измеряли уровень замирания в течение 2 мин.

LTP: Острокаронарные гиппокампальные срезы хранили в искусственной спинномозговой жидкости (CSF) и измеряли LTP после стимуляции 3×100 Гц.

Клетки Phenotypers (предоставлены компанией Sylics, Амстердам, Нидерланды): Мышей помещали в клетки Phenotyper на 3 дня, в течение которых оценивали спонтанное поведение: активность, влияние на поведение циклов свет/темнота, адаптацию, кинематику, профиль фазового перехода свет/темнота и защитное поведение.

Результаты.

Контролировали общее самочувствие, которое не показало различий между животными, получавшими наполнитель, и животными, получавшими SUL-138, при этом все группы демонстрировали сходное увеличение массы тела.

Память оценивали в возрасте 6 месяцев путем измерения замирания после запоминания контекста.

На фиг. 1 показано, как длительное лечение с помощью SUL-138 усиливает память (замирание, %) у мышей дикого типа (WT) и мышей APP. Лечение с помощью SUL-138 повышало уровни замирания (память) как у мышей WT, так и у мышей APP. Критерий Стьюдента, *: $p < 0,05$ **: $p < 0,01$.

Как и ожидалось, при приеме контрольной пищи мыши APP/PS1 проявляли меньший уровень замирания по сравнению с мышами дикого типа. После длительного лечения с помощью SUL-138 память у мышей APP/PS1 восстанавливалась до уровней мышей дикого типа. Это свидетельствует о том, что SUL-138 является эффективным при предотвращении или облегчении болезни Альцгеймера и/или ее симптомов.

Интересно, что мыши WT, получавшие SUL-138, также лучше справлялись с задачей на запоминание. Это указывает на то, что SUL-138 также является эффективным в отношении улучшения функции памяти у здорового млекопитающего.

На фиг. 2 показано, как SUL-138 увеличивает поддержание LTP как у мышей WT, так и у мышей APP. От 8 до 14 гиппокампальных срезов на группу (2A: WT Ctrl, WT SUL-138, 2B: APP Ctrl, APP SUL-138) приобретали LTP, вызванную стимуляцией 3×100 Гц (столбняк) в течение 1 с с интервалом в 20 с. Наклон измеряли в течение 60 мин. LTP выражали в процентах от исходного уровня. Анализ всех данных LTP выполняли в слепом режиме. Поддержание LTP (от 30 до 60 мин) было значительно ($p < 0,05$) выше у животных, принимавших SUL-138 (как у мышей WT, так и мышей APP); критерий Стьюдента*, $P < 0,05$; 2С.

Длительное лечение с помощью SUL-138 не вызвало различий в спонтанном поведении: оценивали активность, влияние на поведение циклов свет/темнота, адаптацию, кинематику, профиль фазового перехода свет/темнота и защитное поведение.

Выводы.

Указанные примеры показали, что SUL-138 усиливает память и LTP как у мышей WT, так и у мышей APP/PS1, а также эффективно восстанавливает память и LTP у мышей APP/PS1 до контрольных уровней.

Увеличение обоих указанных параметров отражает общий процесс повышения пластичности/облегчения LTP, который стимулирует применение SUL-138. Такое обнаружение означает, что SUL-138 можно использовать для облегчения симптомов неврологических заболеваний, которые демонстрируют снижение силы или пластичности синапсов.

Эффекты SUL-138, по-видимому, являются специфическими в отношении улучшения памяти, поскольку лечение не вызвало атипичного поведения у мышей после длительного лечения в течение 3 месяцев. Кроме того, измерения не показали никаких различий в массе в течение 3 месяцев длительного перорального лечения, что может указывать на отвращение или привыкание к пище, обработанной SUL-138, или на изменения в основных физиологических функциях.

Наконец, в течение всего эксперимента не возникало никаких проблем с самочувствием животных

или различий между группами.

Пример 2.

Снижение количества бляшек у мышей APP/PS1 после вмешательства посредством приема SUL-138.

Мышам APP/PS1 (n=10) и мышам дикого типа (WT, n=10) давали либо наполнитель, либо SUL-138. Мышей подвергали лечению в течение 3 месяцев начиная с 3-месячного возраста либо с помощью SUL-138, либо с применением кормовых гранул, обработанных наполнителем. Мышей умерщвляли в возрасте 6 месяцев, в котором (среди прочего) ожидается гиппокамп-зависимое нарушение памяти и заметное накопление бляшек.

Головной мозг, перфузированный с помощью 4% PFA (параформальдегид), хранившийся на сахарозе, нарезают тонкими слоями при 35 мМ с применением криостата (-20°C; Leica). Гиппокампальные срезы (n=2/животное; 5 животных/группа) промывали 3 раза по 10 мин с помощью 1× PBS (фосфатно-солевой буфер), а затем выдерживали в течение 1 ч в блокирующем растворе (10 мл 1× PBS + 500 мкл нормальной козьей сыворотки + 0,250 г бычьего сывороточного альбумина + 20 мкл Triton-100). Срезы инкубировали в течение ночи с антителом к бета-амилоиду (6E10) (ITK Diagnostics, 1:400), промывали 3 раза по 10 мин с помощью 1× PBS, а затем инкубировали со вторичным козьим антимышиным флюоресцирующим антителом с меткой Alexa 488 (Sigma-Aldrich, 1:250) в течение 2 ч. Затем полученные срезы промывали 3 раза по 10 мин с помощью 1× PBS и помещали на предметные стекла.

Срезы визуализировали с помощью высокоэффективного микроскопа Zeiss Cell Discover 7 с конфокальной головкой LSM900. Используя Fiji, были выбраны по отдельности оба гиппокампа для 5 животных на группу (желтая линия на фиг. 3А) и измерены количество и размер бляшек (фиг. 3В, С). Среднее количество бляшек и размер бляшек на животное использовали для статистического анализа в GraphPad 8 с применением одностороннего критерия Стьюдента.

Три месяца перорального приема SUL-138 привели к уменьшению как количества бляшек (фиг. 3В; p=0,0138), так и размера бляшек (фиг. 3С; p=0,0021) у мышей APP/PS1 по сравнению с мышами, получавшими наполнитель. У животных дикого типа, получавших SUL-138 и наполнитель, не было обнаружено никаких бляшек.

Указанные данные вместе с улучшением памяти при приеме SUL-138 и усилением синаптической передачи (долговременной потенциации) у мышей APP/PS1, наблюдаемых в соответствии с примером 1, показали, что SUL-138 представляет собой потенциальное терапевтическое средство против болезни Альцгеймера.

Биодоступность SUL-138 в головном мозге, по-видимому, является высокой, что позволяет, тем самым, преодолеть проблемы других соединений, нацеленных на митохондрии, и делает его более подходящим средством лечения для будущего клинического применения.

Пример 3.

Анализы *in vitro*, демонстрирующие, что соединения согласно настоящему изобретению являются активными.

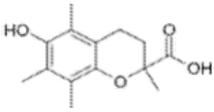
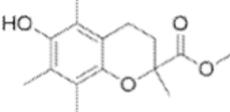
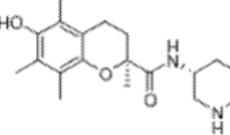
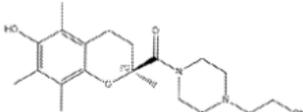
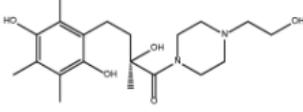
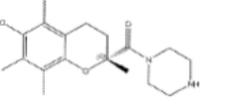
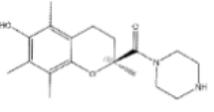
Эксайтотоксичность представляет собой процесс, при котором нервные клетки получают повреждения или погибают, когда уровни на первый взгляд необходимых и безопасных нейротрансмиттеров становятся патологически высокими, что приводит к чрезмерной стимуляции их рецепторов. Эксайтотоксичность может быть связана с нейродегенеративными заболеваниями центральной нервной системы, такими как болезнь Альцгеймера.

В анализах *in vitro* для изучения эксайтотоксичности используют хорошо изученные индукторы гибели нейронных клеток, (например, глутамат, дофамин или NDMA (N-нитрозодиметиламин)), а также количественное определение жизнеспособности стимулированных нейроноподобных клеток. Клеточную линию SH-SY5Y, полученную из нейробластомы человека, можно дифференцировать *in vitro* для придания морфологического и биохимического сходства со зрелыми нейронами. Кроме того, дифференцированные нейроноподобные клетки SH-SY5Y чувствительны к эксайтотоксичности, вызванной, среди прочего, глутаматом и дофамином.

В данном текущем исследовании изучали эффективность SUL-11, SUL-127, SUL-13, SUL-138 (и его основного метаболита SUL-138M2), SUL-150 и SUL-151 для ингибирования вызванной глутаматом и дофамином эксайтотоксичности человеческих нейроноподобных клеток SH-SY5Y. SUL-11 представляет собой тролокс, тогда как SUL-127 представляет собой метиловый эфир тролокса. Указанные два соединения использовали в качестве эталона.

Соединения, применяемые в данном исследовании, показаны в табл. 1.

Таблица 1

Соединение	Химическое название	Формула	Структура	МВт
Эталонные соединения				
SUL-11	6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота	C ₁₄ H ₁₈ O ₄		250,3
SUL-127	метил-6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметил-3,4-дигидро-2H-1-бензопиран-2-карбоксилат	C ₁₅ H ₂₀ O ₄		264,3
Соединения согласно настоящему изобретению		•	•	•
SUL-13	(S)-6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметил-N-((R)-пиперидин-3-ил)хроман-2-карбоксамид	C ₁₉ H ₂₈ N ₂ O ₃		332,4
SUL-138	(S)-(6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-ил)(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)метанон	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₄		362,5
SUL-13 8M2	4-(2,5-дигидрокси-3,4,6-триметилфенил)-2-гидрокси-1-(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)-2-метилбутан-1-он	C ₂₀ H ₃₂ N ₂ O ₅		380,5
SUL-150	(R)-(6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-ил)(пиперазин-1-ил)метанон	C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₃		318,4
SUL-151	(S)-(6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-ил)(пиперазин-1-ил)метанон	C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₃		318,4

Клетки SH-SY5Y нейробластомы человека (ATCC #CRL-2266) выдерживали в среде DMEM (минимальная эссенциальная среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% раствор пенициллина-стрептомицина (# P4333, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури), и пассировали при достижении культурами конfluenceности 70%. Перед экспериментами клетки SH-SY5Y дифференцировали путем восстановления сыворотки (до 1%) и стимуляции с помощью 10 пМ ретиноевой кислоты (# R7882, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) в течение 72 ч. Дифференцированные клетки SH-SY5Y высевали с плотностью $0,6 \times 10^5$ клеток/см² для всех экспериментов.

Дифференцированные клетки SH-SY5Y предварительно инкубировали с соединениями SUL (диапазон доз от 8×10^{-4} до 1×10^{-8} М) в стандартных условиях культивирования в течение 30 мин, а затем стимулировали с применением либо 1-глутамата (60 мМ; # 12843-0, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури), либо допамина (100 мкМ; #H8502, Sigma, Сент-Луис, Миссури) в течение дополнительных 24 ч. К культурам добавляли раствор нейтрального красного для анализа (#N2889, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) с концентрацией 10% (об./об.) в течение последних 4 ч культивирования. Клетки промывали теплым PBS и солибилизовали с помощью нейтрального красного в кислом этаноле (1% уксусная кислота в 50% EtOH). Оптические плотности регистрировали при длине волны 540 нм на планшет-ридере CLARIOStar Plus (BMG Labtech, Германия). Жизнеспособность клеток нормировали к измерениям опти-

ческой плотности не подвергавшихся лечению культур (100% жизнеспособность) и к измерениям оптической плотности образцов, не содержащих клеток (0% жизнеспособности).

Все эксперименты выполняли в трех параллельных анализах на условие и усредняли. Данные, полученные из двух отдельных экспериментов, использовали для оценки в GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc, Калифорния). Четырехпараметрическую нелинейную регрессию использовали для определения эффективности и способности соединений SUL снижать эксайтотоксичность, индуцированную либо 1-глутаматом, либо дофамином. Эффективность соединений SUL для ингибирования эксайтотоксичности рассчитывали как $E_{max} = 100 \times (V_{(treated)} - V_{(vehicle)}) / (100\% - V_{(vehicle)})$, где V представляет собой наблюдаемую жизнеспособность и E_{max} представляет собой максимальный эффект, вызванный приемом соединения SEIL.

Не наблюдали клеточной токсичности в виде снижения жизнеспособности при применении SUL-соединений в молярном диапазоне, показанном ниже в табл. 2.

Клетки SH-SY5Y нейробластомы дифференцировали в нейроноподобные клетки согласно стандартным протоколам и стимулировали с помощью 60 мМ глутамата для индуцирования эксайтотоксичности. Глутамат снижал жизнеспособность клеток SH-SY5Y от $100 \pm 1,63\%$ в контрольных клетках, обработанных наполнителем, до $55,4 \pm 1,7\%$ в клетках SH-SY5Y, подвергавшихся воздействию глутамата в течение 24 ч ($p < 0,0001$). Предварительная инкубация дифференцированных клеток SH-SY5Y с соединениями SEIL (от 10^{-3} до 10^{-8} М) приводила к дозозависимому увеличению жизнеспособности клеток SH-SY5Y, подвергшихся воздействию глутамата, хотя и на разных уровнях. Тролокс и метиловый эфир тролокса были явно менее эффективными, чем другие SEL-соединения, как показано ниже в табл. 2.

Дифференцированные клетки SH-SY5Y нейробластомы стимулировали с помощью 150 пМ дофамина для индуцирования эксайтотоксичности. Дофамин снижал жизнеспособность клеток SH-SY5Y от $100 \pm 0,8\%$ в контрольных клетках, обработанных наполнителем, до $50,5 \pm 1,0\%$ в клетках SH-SY5Y, подвергавшихся воздействию дофамина в течение 24 ч ($p < 0,0001$). Предварительная инкубация дифференцированных клеток SH-SY5Y с помощью соединений SEL (от 10^{-3} до 10^{-8} М) приводила к дозозависимому увеличению жизнеспособности клеток SH-SY5Y, подвергшихся воздействию дофамина, хотя и с разной эффективностью, как показано в табл. 2. В такой модели все соединения снижали жизнеспособность клеток при уровне дозы 10^{-3} М.

Таблица 2

Соединение	Глутаматная эксайтотоксичность		Дофаминовая эксайтотоксичность	
	EC ₅₀ (М)	E _{max} (%)	EC ₅₀ (М)	E _{max} (%)
SEL-11	$4,62 \cdot 10^{-6}$	76,7	$8,35 \cdot 10^{-6}$	79,5
SUL-127	$2,01 \cdot 10^{-5}$	90,4	$3,53 \cdot 10^{-6}$	69,5
SUL-13	$3,82 \cdot 10^{-6}$	100,0	$3,24 \cdot 10^{-7}$	91,9
SUL-138	$1,42 \cdot 10^{-6}$	100,0	$6,60 \cdot 10^{-7}$	100,0
SUL-138M2	$4,43 \cdot 10^{-6}$	100,0	$1,69 \cdot 10^{-6}$	94,7
SUL-150	$1,22 \cdot 10^{-7}$	100,0	$5,55 \cdot 10^{-8}$	100,0
SUL-151	$9,61 \cdot 10^{-8}$	100,0	$6,92 \cdot 10^{-8}$	100,0

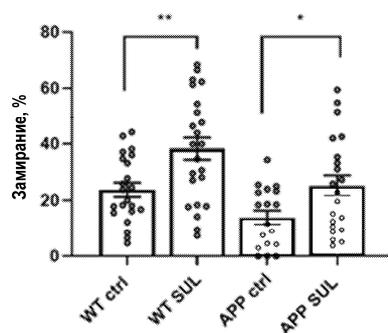
Результаты в приведенной таблице показывают, что соединения SUL согласно настоящему изобретению демонстрируют или улучшенную EC₅₀ (т.е. активны при более низкой концентрации), и/или улучшенную E_{max} (т.е. восстановление токсичности происходит на более высоком уровне). Таким образом, указанный пример показал, что наряду с SUL-138 другие заявленные SUL-соединения также, вероятно, имеют преимущества, связанные с улучшением функции памяти и/или уменьшением образования бляшек; т.е. в целом эффективны при лечении болезни Альцгеймера.

Эталонный эксперимент А.

Ткань гиппокампа мышей дикого типа и мышей APP/PS1 исследовали на экспрессию белка простагландинсинтазы и тромбоксансинтазы А. В ткани гиппокампа как мышей дикого типа, так и мышей APP/PS1 были обнаружены пептиды, напоминающие простагландинсинтазу PTGS1, PTGES2, PTGES3 и PTGFS. Не были обнаружены белковые фрагменты PTGS2, PTGDS, PTGES1, PTGIS и TXA. Лечение с помощью SUL-138 мышей дикого типа или мышей APP/PS1 не изменяло экспрессию белка ферментов, синтезирующих простагландин.

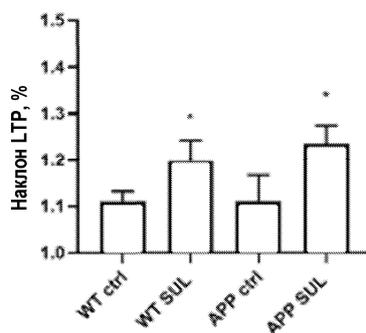
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Применение S-(6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-ил)(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)метанон (SUL-138) или его фармацевтически приемлемой соли для улучшения функции памяти и/или уменьшения количества бляшек у пациента с болезнью Альцгеймера.

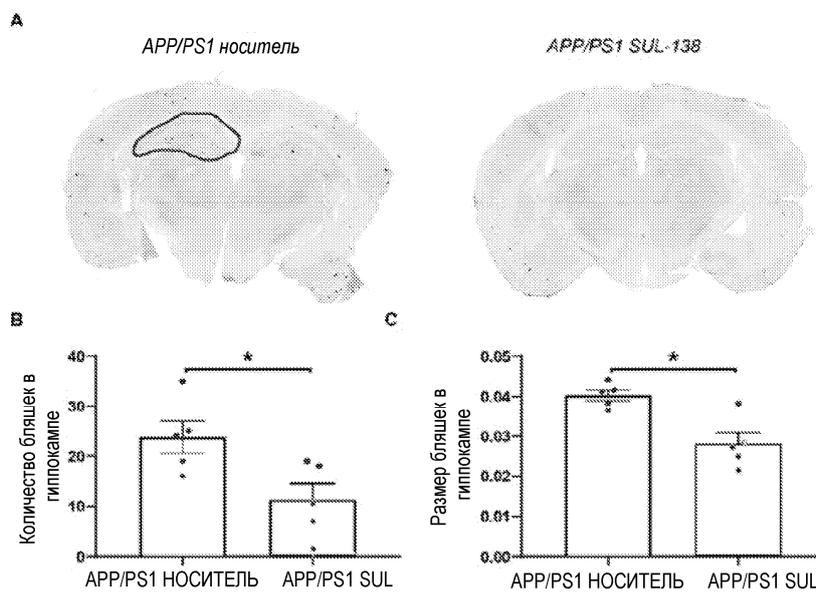


Фиг. 1

Минуты: 30-60



Фиг. 2



Фиг. 3

