

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490281 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.03.21(22) Дата подачи заявки
2022.07.20(51) Int. Cl. C07D 307/83 (2006.01)
A61K 31/343 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(54) СОЕДИНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С ИШЕМИЧЕСКИМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ ГОЛОВНОГО МОЗГА

(31) 202110829381.4

(32) 2021.07.21

(33) CN

(86) PCT/CN2022/106618

(87) WO 2023/001164 2023.01.26

(71) Заявитель:

ЦЗЯНСУ ЧИА ТАЙ ФЭНХАЙ
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД. (CN)

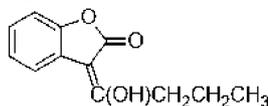
(72) Изобретатель:

Чжу Юнцян, Лю Цзя, Ван Цзя, Чэнь
Ци, Ян Ян (CN)

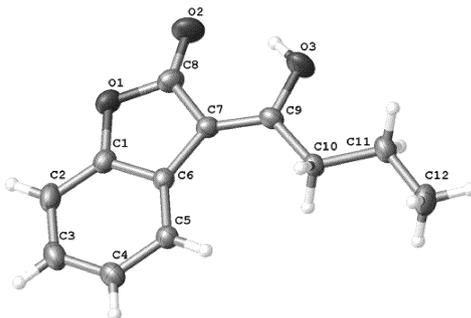
(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Соединение для лечения заболеваний, связанных с ишемическим повреждением головного мозга. Структура соединения представлена ниже формулой (II). Соединение, раскрытое в этом документе, демонстрирует более высокую биодоступность и более высокие концентрации в плазме крови и в тканях головного мозга крыс после распределения в организме; также оно демонстрирует хороший эффект при лечении ишемического повреждения головного мозга.



(II)



A1

202490281

202490281

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580331EA/030

СОЕДИНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С ИШЕМИЧЕСКИМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ ГОЛОВНОГО МОЗГА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к соединениям и фармацевтическим композициям, которые оказывают терапевтический эффект при ишемии головного мозга и постишемическом воспалении, обладают противосудорожным действием и способны компенсировать неврологическую функциональную недостаточность у пациентов с ишемическим инсультом, а также к способу лечения заболеваний, связанных с ишемическим повреждением и некрозом нейронов головного мозга.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Белое вещество головного мозга является важным компонентом центральной нервной системы и местом скопления нервных волокон. Поражения белого вещества головного мозга (WML) обычно вызваны снижением кровотока и недостаточным снабжением кровеносных сосудов кислородом. В случае нарушения (недостаточности) кровоснабжения головного мозга возникает ряд симптомов, обусловленных трудностью в удовлетворении метаболических потребностей тканей головного мозга. Клинические проявления могут включать головокружение, головную боль, онемение конечностей или временную потерю сознания; в серьезных случаях может наступить необратимое повреждение функции головного мозга и даже смерть. Заболевания, связанные с ишемией головного мозга, включают транзиторную ишемическую атаку (ТИА), ишемический инсульт головного мозга (инфаркт головного мозга), болезнь Мойя-мойя, хроническую недостаточность мозгового кровообращения и тому подобное. Эти заболевания также вносят свой вклад в снижение когнитивных функций и развитие сосудистой деменции у пациентов.

В настоящее время существует множество лекарственных препаратов для лечения заболеваний, вызванных ишемией головного мозга, но лишь немногие из них действительно эффективны. Препарат нимодипин, доступный в настоящее время, оказывает профилактический эффект в отношении ишемии головного мозга, однако его терапевтическая эффективность не доказана. В 2005 году в Китае для лечения острого ишемического инсульта головного мозга легкой и умеренной степени тяжести был одобрен 3-*n*-бутилфталид (NBP), экстрагируемый из эфирного масла семян сельдерея, однако механизм его действия до настоящего времени не установлен, а при клиническом применении он может вызывать побочные реакции, такие как нарушение функции печени, нарушения со стороны пищеварительного тракта и тому подобное.

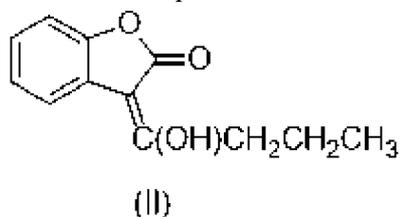
Ишемия головного мозга может вызывать повреждение и некроз черепно-мозговых нервов различной степени выраженности, и тем самым приводить к нарушению функций соответствующих систем человеческого организма, существенно снижая качество жизни пациентов. В настоящее время по-прежнему существует потребность в новых соединениях,

демонстрирующих высокую эффективность, оказывающих терапевтический эффект при ишемии головного мозга и постишемическом воспалении, обладающих противосудорожным действием и способных компенсировать неврологическую функциональную недостаточность у пациентов с ишемическим инсультом головного мозга, тем самым способствуя облегчению дисмнезии, защите нервных клеток и гематоэнцефалического барьера и т. п.

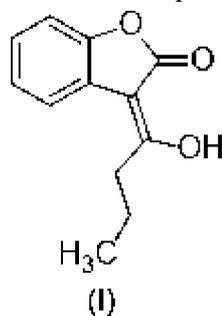
РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предметом настоящего изобретения является новое соединение, которое оказывает терапевтический эффект при ишемии головного мозга и постишемическом воспалении, обладает противосудорожным действием и способно компенсировать неврологическую функциональную недостаточность у пациентов с ишемическим инсультом, и при этом данное соединение применяется для лечения заболеваний, связанных с ишемическим повреждением и некрозом нейронов головного мозга.

Предметом настоящего изобретения является соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемая соль:



Предметом настоящего изобретения также является соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль:



Предметом настоящего изобретения также является фармацевтическая композиция, которая содержит описанное в этом документе соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

Предметом настоящего изобретения также является фармацевтическая композиция, которая содержит описанное в этом документе соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

Предметом настоящего изобретения также является применение описанного в этом документе соединения формулы (II) или его фармацевтически приемлемой соли для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения и/или

профилактики заболеваний, связанных с ишемическим повреждением головного мозга.

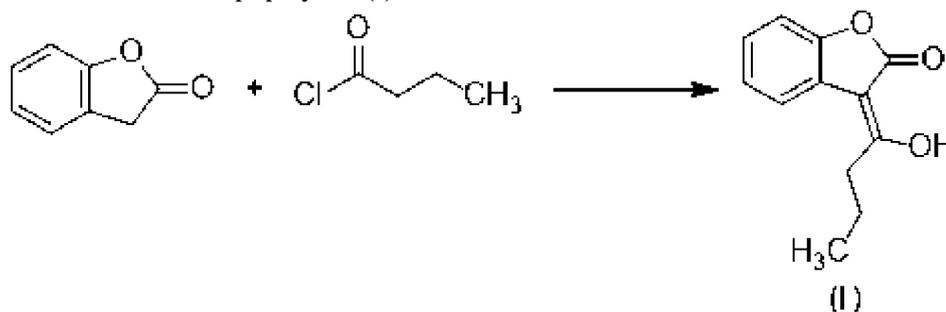
Предметом настоящего изобретения также является применение описанного в этом документе соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения и/или профилактики заболеваний, связанных с ишемическим повреждением головного мозга.

Предметом настоящего изобретения также является применение описанной в этом документе композиции для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения и/или профилактики заболеваний, связанных с ишемическим повреждением головного мозга.

Заболевания, связанные с ишемическим повреждением головного мозга, описанные в настоящем документе, включают, помимо прочего, ишемический инсульт головного мозга, сосудистую деменцию, постишемическое воспаление, судороги, ишемическое повреждение или некроз нейронов и т. п.

Предметом настоящего изобретения также является метод синтеза соединения формулы (I) и соединения формулы (II), описанных в настоящем документе.

В конкретном примере предметом настоящего изобретения является метод получения соединения формулы (I):



Предметом настоящего изобретения также является монокристалл соединения формулы (I), описанного в настоящем документе, который имеет следующие параметры элементарной ячейки:

Кристаллическая система	Моноклинные сингония
Пространственная группа	$P2_1/c$
$a/\text{Å}$	7,318(6)
$b/\text{Å}$	20,279(17)
$c/\text{Å}$	7,458(7)
$\alpha/^\circ$	90
$\beta/^\circ$	111,417(16)
$\gamma/^\circ$	90
Объем элементарной ячейки/ Å^3	1030,2(16)
Z	4

В конкретном примере асимметричная ячейка монокристалла соединения формулы

(I) показана на РИС. 2.

Предметом настоящего изобретения также является метод получения монокристалла, который включает растворение соединения формулы (I), описанного в этом документе, в петролейном эфире, фильтрование, покрытие фильтрата пленкой с мелкими отверстиями и помещение фильтрата в вентилируемое помещение, что обеспечивает медленное испарение растворителя при комнатной температуре с образованием монокристалла.

Соединение, описанное в этом документе, демонстрирует более высокую биодоступность и более высокие концентрации в плазме крови и в тканях головного мозга крыс после распределения в организме; оно также демонстрирует хороший эффект при ишемическом повреждении головного мозга.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

РИС. 1 представляет собой микрофотографию монокристалла (Z)-3-(1-гидроксипропилиден)бензофуран-2(3H)-она;

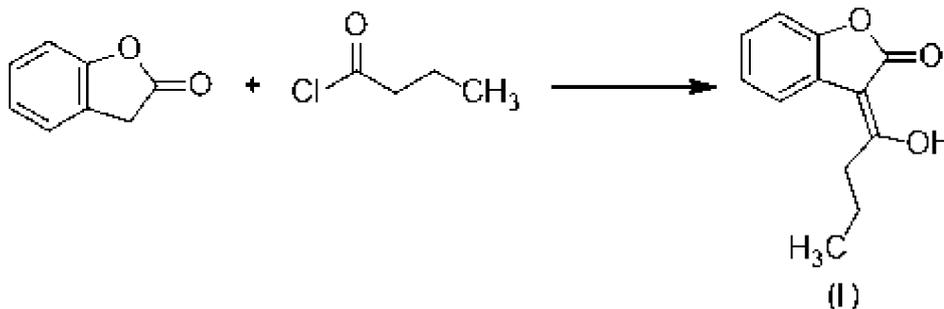
РИС. 2 представляет собой изображение асимметричной ячейки монокристалла (Z)-3-(1-гидроксипропилиден)бензофуран-2(3H)-она.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Ниже приводится дополнительное описание настоящего изобретения со ссылкой на конкретные примеры в соответствии с общими техническими знаниями и общепринятой практикой в данной области техники. Следующие примеры представляют собой лишь некоторые из предпочтительных примеров осуществления настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения, а для специалистов в данной области техники очевидно, что в эти примеры может быть внесен ряд модификаций без выхода за рамки настоящего изобретения; эти модификации также должны подпадать под объем правовой защиты настоящего изобретения.

Пример 1

Синтез (Z)-3-(1-гидроксипропилиден)бензофуран-2(3H)-она



3-бензофуранон (5,0 г, 37,3 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в дихлорметане (50 мл) и охлаждали смесь до 5 °С, после чего к полученному раствору медленно добавляли *трет*-бутоксид калия (6 г, 53,5 ммоль, 1,4 экв.). Полученную смесь оставляли реагировать в течение 0,5 ч, а затем медленно добавляли к ней *n*-бутирилхлорид (8 г, 75,0 ммоль, 2,0 экв.). Смесь оставляли реагировать в течение 1 ч, а затем добавляли воду (50 мл) для проведения экстракции. Органическую фазу промывали 0,1 N соляной кислотой для подкисления (рН

< 2), сушили над безводным сульфатом натрия (5 г) в течение 0,5 ч, фильтровали и концентрировали с получением масляного продукта, который затем очищали препаративной хроматографией высокого давления, после чего очищенный раствор лиофилизировали с получением соединения формулы (I), (Z)-3-(1-гидроксibuтилиден)бензофуран-2(3H)-она, в виде белого твердого вещества (2,5 г, 32,9%).

¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ12,02 (s, 1H), 7,35-7,33 (d, 1H), 7,28-7,17 (m, 3H), 2,76-2,73 (m, 2H), 1,90-1,80 (m, 2H), 1,12-1,08 (m, 3H).

¹H ЯМР (CDCl₃+D₂O, 400 МГц): δ7,34-7,32 (d, 1H), 7,28-7,16 (m, 3H), 2,76-2,72 (m, 2H), 1,89-1,80 (m, 2H), 1,12-1,08 (m, 3H).

Пример 2

Получение монокристалла (Z)-3-(1-гидроксibuтилиден)бензофуран-2(3H)-она
20 мг (0,098 ммоль) (Z)-3-(1-гидроксibuтилиден)бензофуран-2(3H)-она, полученного в примере 3, растворяли в петролейном эфире (0,4 мл). Смесь фильтровали, затем фильтрат покрывали мембраной с мелкими отверстиями и помещали в вытяжной шкаф, где растворитель медленно испарялся при комнатной температуре в течение 24 ч, в результате чего образовывался монокристалл (Z)-3-(1-гидроксibuтилиден)бензофуран-2(3H)-она (РИС. 1).

Рентгенографические характеристики монокристалла (Z)-3-(1-гидроксibuтилиден)бензофуран-2(3H)-она получали с использованием дифрактометра Bruker D8 Venture, источником света в котором служил молибденовый (Mo) анод, генерирующий Kα-излучение (λ=0,71073 Å). Во время сбора данных температура кристалла поддерживалась на уровне 296 К. Анализ структуры монокристалла проводили с использованием программы Olex2. Для расчета исходной структуры использовали метод Intrinsic Phasing в программе SHELXT, а уточнение структуры проводили методом наименьших квадратов в программе SHELXL. Кристаллографические данные и параметры уточнения структуры (Z)-3-(1-гидроксibuтилиден)бензофуран-2(3H)-она приведены в табл. 1, а асимметричные ячейки монокристалла (Z)-3-(1-гидроксibuтилиден)бензофуран-2(3H)-она показаны на РИС. 2.

Таблица 1. Кристаллографические данные и параметры уточнения структуры (Z)-3-(1-гидроксibuтилиден)бензофуран-2(3H)-она

Эмпирическая формула	C ₁₂ H ₁₂ O ₃
Молекулярная масса	204,22
Температура/К	296,15
Кристаллическая система	Моноклинная сингония
Пространственная группа	P2 ₁ /c
a/Å	7,318(6)
b/Å	20,279(17)
c/Å	7,458(7)
α/°	90

$\beta/^\circ$	111,417(16)
$\gamma/^\circ$	90
Объем элементарной ячейки/ \AA^3	1030,2(16)
Z	4
$\rho_{\text{расч}}/\text{г}/\text{см}^3$	1,317
$\mu/\text{мм}^{-1}$	0,094
F(000)	432,0
Размер кристалла/ мм^3	$0,18 \times 0,18 \times 0,16$
Источник света для дифракции	MoK α ($\lambda=0,71073 \text{ \AA}$)
Диапазон углов 2θ для сбора данных / $^\circ$	От 4,018 до 54,558
Диапазон коэффициента дифракции	$-9 \leq h \leq 9, -25 \leq k \leq 26, -9 \leq l \leq 9$
Количество собранных точек дифракции	7840
Количество независимых точек дифракции	2303 [$R_{\text{int}}=0,0291, R_{\text{sigma}}=0,0290$]
Данные/предел/параметр	2303/0/138
Точность аппроксимации по F^2	1,057
Конечный R-фактор [$I \geq 2\sigma(I)$]	$R_1=0,0511, wR_2=0,1280$
Конечный R-фактор [все данные]	$R_1=0,0662, wR_2=0,1389$
Экстремум/седловая точка максимальной остаточной электронной плотности/ $e \text{ \AA}^{-3}$	0,23/-0,41

Биологические испытания

Следующие испытания демонстрируют, что соединение (I) по настоящему изобретению способно компенсировать ишемическую неврологическую функциональную недостаточность. Результаты испытаний также показывают, что соединение (I) по настоящему изобретению характеризуется хорошей биодоступностью и оказывает лекарственный эффект после перорального введения.

Испытание 1. Исследование фармакокинетики на крысах

Самцам крыс линии SD (весом 180-260 г) вводили соединение (I) в дозе 1,0 мг/кг путем инъекции в хвостовую вену и в дозе 10,0 мг/кг перорально. Каждая группа включала 3 животных. Растворителем для введения служил физиологический раствор, содержащий 5% ДМСО и 5% полиэтоксилированное касторовое масло (Cremophor EL). В течение 12 ч перед введением препарата крысам не давали пищу, а через 4 ч после введения им предоставляли неограниченный (*ad libitum*) доступ к пище; вода была доступна животным постоянно. Перед введением, а также через 5, 15, 30 мин, 1, 2, 4, 6, 8 и 24 ч после введения у крыс из ретроорбитального синуса брали примерно по 0,2 мл крови. Образцы помещали в пробирки EP с антикоагулянтом ЭДТА-K2, находящиеся на ледяной бане, после чего центрифугировали их при низкой скорости (3500 об/мин) при 4°C в течение 10 минут для отделения плазмы, которую затем хранили при температуре -20°C до проведения анализа.

Концентрацию соединения (I) в плазме определяли методом жидкостной хроматографии в комбинации с масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС). Фармакокинетические параметры рассчитывали из результатов анализа образцов с использованием программы WinNonlin.

Как видно из данных в табл. 2, после перорального введения соединение (I) выводилось из организма крыс дольше, а его биодоступность была выше (биодоступность выше 100%, предположительно, обусловлена нелинейной фармакокинетикой), чем следует из данных, приведенных в литературе, посвященной NBP (Wang Ningning, Li Yue, Li Xiaohong, Jiang Mingyan, RP-HPLC determination of the content of 3-*n*-butylphthalide in plasma of rats and pharmacokinetics thereof, *Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies*, Dec. 2012, Vol. 31, Issue 12, pp.743-747).

Таблица 2. Фармакокинетические параметры

Параметр	Ед. измер.	Соединение (I)		Бутилфталид (значение из литературы ^[1])	
		в/в 1 мг/кг	п/о 10 мг/кг	в/в 10 мг/кг	п/о 60 мг/кг
T _{1/2}	ч	7,5	9,6	2,2	2,83
T _{max}	ч	/	0,5	/	0,7
C _{max}	нг/мл	/	56533,3	/	2900,0
MRT _{inf}	ч	9,8	13,2	2,4	3,8
AUC _{0-t}	ч·нг/мл	52515,0	702610,0	7230,0	7110,0
AUC _{0-inf}	ч·нг/мл	59248,7	854122,3	8620,0	8560,0
F	%	144.2		16.6*	

* Рассчитано на основе значения AUC_{0-inf} в литературе, указанного в таблице

Испытание 2. Распределение по тканям головного мозга крыс

Самцам мышей линии SD (весом 200-270 г) перорально вводили соединение (I) и бутилфталид (NBP) в дозе 20 мг/кг (по отдельности). Образцы плазмы и тканей головного мозга животных собирали через 0,5, 1, 4 и 24 ч после введения. Сбор плазмы: 0,2 мл цельной крови собирали в пробирки EP, содержащие ЭДТА-К2, центрифугировали при 3500 g в течение 10 минут, а затем собирали плазму (верхнюю часть), которую хранили при -20 °С. Сбор тканей головного мозга: после эвтаназии животных необходимое количество тканей головного мозга взвешивали и гомогенизировали с метанолом в воде (80%, мас./об.) в соотношении 1:4. Концентрацию соединения в образцах плазмы и тканей головного мозга определяли методом жидкостной хроматографии в комбинации с масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС).

Как видно из данных табл. 3, концентрация соединения (I) по настоящему изобретению в плазме и тканях головного мозга крыс после распределения в организме была выше в случае перорального введения.

Таблица 3. Концентрации соединения в плазме и тканях головного мозга крыс

Моменты взятия образцов	Соединение (I) в дозе 20 мг/кг перорально		NBP в дозе 20 мг/кг перорально	
	Измеренное значение в плазме	Измеренное значение в тканях головного мозга	Измеренное значение в плазме	Измеренное значение в тканях головного мозга
	Концентрация (нг/мл)	Концентрация (нг/г)	Концентрация (нг/мл)	Концентрация (нг/г)
0,5 ч	241333,3	8733,3	26,0	28,5
1 ч	192333,3	5726,7	19,1	22,8
4 ч	182333,3	5030,0	7,2	10,2
24 ч	23500,0	285,3	1,7	НД

НД - ниже нижнего предела количественного определения

Испытание 3. Фармакодинамическое исследование соединения в экспериментальной модели инсульта головного мозга у крыс (однократное введение)

Экспериментальную модель окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) у крыс линии SD осуществляли с использованием метода шовной окклюзии с целью оценки защитного эффекта соединения в отношении нейронов крыс после ишемии-реперфузии головного мозга. После индукции анестезии 3,0%-ным изофлураном у крыс линии SD (массой 240-270 г) выполняли хирургическое вмешательство, при котором рассекали правую часть шеи для обнаружения правой общей сонной артерии (ОСА), наружной сонной артерии (НСА) и внутренней сонной артерии (ВСА). НСА лигировали. ВСА подвергали временной окклюзии. На проксимальный и дистальный концы ОСА накладывали швы. Дистальный конец надежно лигировали, а проксимальный конец перевязывали слабым узлом. На ОСА между этими двумя швами делали небольшой разрез. Через разрез ОСА вводили нить № 4-0, после чего медленно и аккуратно проталкивали ее в ВСА. По достижении артериального зажима ВСА проталкивание нити на время останавливали. Шов перед местом лигирования дополнительно затягивали. Артериальный зажим, блокирующий кровоток в ВСА, удаляли, что позволяло продвинуть шовную окклюзию в ВСА до ее вхождения во внутрочерепную область. Когда вводимая нить находилась примерно в 18 мм от бифуркации ОСА, ощущалось небольшое сопротивление, что указывало на то, что передний конец нити уже вошел в переднюю мозговую артерию (ПМА), а отверстие средней мозговой артерии уже заблокировано боковой стенкой шовной окклюзии. В этот момент введение прекращали и регистрировали время. Артериальный зажим на ОСА убирали, а разрез закрывали после прекращения активного кровотечения. Крыс с ишемией оставляли в помещении при комнатной температуре с тем, чтобы температура их тела сохранялась на уровне 37 °С и чтобы через 120 минут можно было провести индукцию анестезии. Когда крысы находились под анестезией, нить медленно и постепенно извлекали таким образом, чтобы проксимальный конец нити возвратился в НСА, тем самым

инициировав реперфузию средней мозговой артерии. Сразу после реперфузии (в течение 10 мин) животным однократно вводили препарат. Всех животных разделили на 3 группы: контрольная группа с ишемией (модельная контрольная группа), группа с в/в введением соединения (I) (30 мг/кг) и группа с п/о введением соединения (I) (60 мг/кг). Через 24 ч после реперфузии ишемии животных усыпляли, после чего головной мозг быстро извлекали, замораживали и разрезали для окрашивания трифенилтетразолия хлоридом (ТТС). Нормальные ткани после окрашивания имели розово-красный цвет, в то время как ткани, поврежденные ишемией (инфарктные ткани), были белыми. Для оценки степени ишемического повреждения головного мозга у крыс используют такой показатель, как размер инфаркта (%), который рассчитывают как отношение массы поврежденных ишемией тканей к массе всего головного мозга.

В первый день после хирургического вмешательства окрашивание красителем ТТС показало, что размер инфаркта головного мозга в модельной контрольной группе составляет $21,63 \pm 5,66\%$, в то время как размер инфаркта головного мозга в группе с в/в введением соединения (I) и в группе с п/о введением соединения (I) составляет $13,61 \pm 3,66\%$ и $14,88 \pm 5,11\%$ соответственно. Это говорит о том, что соединение (I) и в случае в/в введения, и в случае п/о введения способно статистически значимо уменьшать размер инфаркта головного мозга у животных ($p=0,0025$ и $p=0,0389$); при этом степень снижения размера (ингибирования) инфаркта головного мозга у животных в группе с в/в введением соединения (I) составляет 37,1%, а в группе с п/о введением соединения (I) - 31,2%. В совокупности эти результаты демонстрируют, что соединение (I) обладает хорошей способностью улучшать исходы инфаркта головного мозга у крыс, как подробно описано в табл. 4.

Таблица 4. Размер инфаркта головного мозга и степень ингибирования инфаркта головного мозга у экспериментальных животных

Группа	Размер инфаркта (%)	Степень ингибирования инфаркта головного мозга (%)
Модельная контрольная группа (N=13)	$21,63 \pm 5,66$	-
Группа с в/в введением соединения (I) (N=12)	$13,61 \pm 3,66^{**}$	37,1
Группа с п/о введением соединения (I) (N=10)	$14,88 \pm 5,11^*$	31,2

Примечание. Все данные в таблице выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение (среднее значение \pm CO); N - число животных в каждой группе для статистического анализа; «-» означает, что данные для этой позиции отсутствуют; * означает, что p составляет $< 0,05$ при сравнении с животными из модельной контрольной группы; ** означает, что p составляет $< 0,01$ при сравнении с животными из модельной контрольной группы.

Испытание 4. Среднесрочное и долгосрочное фармакодинамическое исследование соединения по настоящему изобретению на экспериментальной модели инсульта головного мозга у крыс

Экспериментальные модели окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) у крыс линии SD осуществляли с использованием метода шовной окклюзии. Крысам вводили исследуемое соединение в течение 28 дней подряд. Фармакодинамическую оценку исследуемого соединения при инсульте головного мозга получали на основе данных общего наблюдения и оценки нейроповеденческих функций.

После индукции анестезии 3,0%-ным изофлураном у крыс линии SD (массой 240-280 г) выполняли оперативное вмешательство. При этом рассекали правую часть шеи для обнаружения правой общей сонной артерии (ОСА), наружной сонной артерии (НСА) и внутренней сонной артерии (ВСА). НСА лигировали. ВСА подвергали временной окклюзии. На проксимальный и дистальный концы ОСА накладывали швы. Дистальный конец надежно лигировали, а проксимальный конец перевязывали слабым узлом. На ОСА между этими двумя швами делали небольшой разрез. Через разрез ОСА вводили нить № 4-0, после чего медленно и аккуратно проталкивали ее в ВСА. По достижении артериального зажима ВСА проталкивание нити на время останавливали. Шов перед местом лигирования дополнительно затягивали. Артериальный зажим, блокирующий кровоток в ВСА, удаляли, что позволяло продвинуть шовную окклюзию в ВСА до ее вхождения во внутрочерепную область. Когда вводимая нить находилась примерно в 18 мм от бифуркации ОСА, ощущалось небольшое сопротивление, что указывало на то, что передний конец нити уже вошел в переднюю мозговую артерию (ПМА), а отверстие средней мозговой артерии уже заблокировано боковой стенкой шовной окклюзии. В этот момент введение прекращали и регистрировали время. Артериальный зажим на ОСА убирали, а разрез закрывали после прекращения активного кровотечения. Крыс с ишемией оставляли в помещении при комнатной температуре с тем, чтобы температура их тела сохранялась на уровне 37 °С и чтобы через 120 минут можно было провести индукцию анестезии. Когда крысы находились под анестезией, нить медленно и постепенно извлекали таким образом, чтобы проксимальный конец нити возвратился в НСА, тем самым инициировав реперфузию средней мозговой артерии. Животные получали назначенную дозу препарата сразу (в течение 10 мин) после реперфузии. Животные продолжали получать препарат один раз в сутки в течение 28 дней; при этом день хирургического вмешательства определялся как Д1 (день 1). Всех животных разделили на 5 групп: группа имитации хирургического вмешательства, контрольная группа с ишемией (модельная контрольная группа), группа NBP (60 мг/кг перорально 1 раз в сутки), группа соединения (I) в низкой дозе п/о (6 мг/кг перорально 1 раз в сутки) и группа соединения (I) в высокой дозе п/о (20 мг/кг перорально 1 раз в сутки). В период применения препарата всех животных подвергали тесту с ходьбой по решетке (Д7, Д14, Д21 и Д28, всего - 4 раза) и тесту на распознавание новых объектов (адаптация к распознаванию новых объектов в Д26, тест в Д27). По завершении 28-дневного периода дозирования всех выживших животных, которые были взяты в исследование,

усыпляли, после чего у них быстро брали головной мозг для проведения патоморфологического исследования.

(1) Результаты тестов с ходьбой по решетке показали следующее: через неделю после хирургического вмешательства частота ошибок (неверных шагов) у животных в модельной контрольной группе составила $7,24 \pm 3,59$ раза, в то время как частота ошибок в группе NBP, в группе соединения (I) в низкой дозе и в группе соединения (I) в высокой дозе составила $7,37 \pm 3,03$ раза, $5,33 \pm 2,33$ раза и $4,23 \pm 1,44$ раза, соответственно; при этом частота ошибок у животных из группы соединения (I) в высокой дозе была достоверно ниже, чем у животных из модельной контрольной группы ($p=0,0172$). Через 2-3 недели после хирургического вмешательства частота ошибок у животных из модельной контрольной группы уменьшилась за счет постепенного восстановления двигательной функции, и частота ошибок в группе соединения (I) в высокой дозе уже достоверно не отличалась от таковой у животных из модельной контрольной группы, хотя тенденция к пониженной частоте ошибок в группе соединения (I) по-прежнему сохранялась. Через 4 недели после хирургического вмешательства частота ошибок у животных из модельной контрольной группы снизилась до уровня, наблюдавшегося у животных из группы имитации хирургического вмешательства. Результаты, приведенные выше, демонстрируют, что соединение (I) оказывает эффект, состоящий в ослаблении нарушений ходьбы у животных после инсульта головного мозга (подробности см. в табл. 5).

Таблица 5. Результаты теста с ходьбой по решетке

Группа	Частота ошибок (число случаев)			
	1Н	2Н	3Н	4Н
Группа имитации хирургического вмешательства (12)	$0,96 \pm 0,66$	$0,79 \pm 0,56$	$0,88 \pm 0,82$	$1,79 \pm 0,92$
Модельная контрольная группа (N=17)	$7,24 \pm 3,59$	$5,35 \pm 4,40$	$4,09 \pm 3,140$	$1,59 \pm 0,84$
Группа NBP (N=15)	$7,37 \pm 3,03$	$8,10 \pm 2,97$	$6,27 \pm 2,890$	$2,10 \pm 1,46$
Группа соединения (I) в низкой дозе (N=12)	$5,33 \pm 2,33$	$6,33 \pm 3,53$	$4,38 \pm 2,44$	$2,58 \pm 1,55$
Группа соединения (I) в высокой дозе (N=13)	$4,23 \pm 1,44^*$	$3,23 \pm 2,56$	$2,50 \pm 0,81$	$1,42 \pm 1,11$

Примечание. Все данные в таблице выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение (среднее значение \pm СО); N - число животных в каждой группе для статистического анализа; «1Н, 2Н, 3Н и 4Н» означают 1 неделю, 2 недели, 3 недели и 4 недели после хирургического вмешательства соответственно; * означает, что p составляет $< 0,05$ при сравнении с модельной контрольной группой.

(2) В последний день применения препарата проводили тест на распознавание новых

объектов и рассчитывали индекс распознавания новых объектов (NRI) для животных из каждой группы. Индекс NRI у животных из модельной контрольной группы составил $54,81 \pm 21,94\%$, что достоверно не отличалось от индекса распознавания знакомых объектов (FRI); при этом значения NRI у животных из группы NBP, группы соединения (I) в низкой дозе и группы соединения (I) в высокой дозе составили $70,97 \pm 22,57\%$, $70,98 \pm 22,60\%$ и $71,66 \pm 17,06\%$, соответственно, причем в группе NBP, группе соединения (I) в низкой дозе и группе соединения (I) в высокой дозе значения NRI и FRI статистически значимо различались ($p=0,0074$, $p=0,0212$ и $p=0,0009$, соответственно), а значения NRI в группе соединения (I) в низкой дозе и в группе соединения (I) в высокой дозе были сопоставимы с таковыми у животных из группы имитации хирургического вмешательства ($66,51 \pm 10,80\%$). Результаты, приведенные выше, показывают, что соединение (I) способно значительно ослаблять когнитивные нарушения у животных после инсульта головного мозга (подробности см. в табл. 6).

Таблица 6. Результаты теста на распознавание новых объектов

Группа	Время обнюхивания (с)		Индекс распознавания (%)	
	Новый объект	Знакомый объект	Новый объект	Знакомый объект
Группа имитации хирургического вмешательства (11)	10,52±4,00	5,70±3,19	66,51±10,80***	33,49±10,80
Модельная контрольная группа (N=14)	3,82±3,40	2,70±2,22	54,81±21,94	45,19±21,94
Группа NBP (N=13)	4,94±3,60	1,60±1,01	70,97±22,57**	29,03±22,57
Группа соединения (I) в низкой дозе (N=10)	4,74±3,61	1,54±1,10	70,98±22,60*	29,02±22,60
Группа соединения (I) в высокой дозе (N=13)	5,62±3,60	2,20±1,66	71,66±17,06***	28,34±17,06

Примечание. Все данные в таблице выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение (среднее значение \pm CO); N - число животных в каждой группе для статистического анализа; * означает, что p составляет $< 0,05$ при сравнении с модельной контрольной группой, ** означает, что p составляет $< 0,01$ при сравнении с модельной контрольной группой и *** означает, что p составляет $< 0,001$ при сравнении с модельной контрольной группой.

(3) Патоморфологическое исследование. 1) Диапазон восстановления: образцы с площадью восстановления $> 30\%$ считаются образцами с хорошим восстановлением, тогда как образцы с площадью восстановления $\leq 30\%$ считаются образцами с плохим восстановлением. В модельной контрольной группе доля животных, демонстрирующих

хорошее восстановление, составила 17,6%, тогда как в группе NBP, группе соединения (I) в низкой дозе и группе соединения (I) в высокой дозе доля животных с площадью восстановления $> 30\%$ составила 21,4%, 33,3% и 75,0%, соответственно; при этом в группе соединения (I) в высокой дозе доля животных с хорошим восстановлением была наибольшей и достоверно превосходила таковую в модельной контрольной группе (критерий хи-квадрат, $p=0,0080$). Результаты, приведенные выше, показывают, что соединение (I) способствует восстановлению зоны инфаркта (подробности см. в табл. 7). 2) Количество кровеносных сосудов с перфузией в зоне восстановления после инфаркта: количество эритроцитсодержащих сосудов сравнивали с использованием двух критериев: ≤ 10 и > 10 сосудов. У всех животных из группы имитации хирургического вмешательства количество кровеносных сосудов с перфузией было более 10, а их доля составляла 100%; в модельной контрольной группе количество животных, у которых в зоне восстановления после инфаркта имелось ≤ 10 и > 10 эритроцитсодержащих кровеносных сосудов, составило 10 и 7 соответственно, а доля животных, у которых имелось > 10 сосудов, содержащих эритроциты, составила 41,2%; в группе NBP количество животных, у которых в зоне восстановления после инфаркта имелось ≤ 10 и > 10 эритроцитсодержащих кровеносных сосудов, составило 1 и 14 соответственно, а доля животных, у которых имелось > 10 кровеносных сосудов, содержащих эритроциты, составила 93,3%, что статистически значимо отличалось от таковой в модельной контрольной группе (критерий хи-квадрат, $p=0,0028$); в группе соединения (I) в низкой дозе и в группе соединения (I) в высокой дозе количество животных, у которых в зоне восстановления после инфаркта имелось ≤ 10 и > 10 кровеносных сосудов, содержащих эритроциты, составило 0/12 и 1/12 соответственно, и при этом количество животных, у которых имелось > 10 кровеносных сосудов, содержащих эритроциты, статистически значимо превышало количество таковых в модельной контрольной группе (критерий хи-квадрат, $p=0,0012$, $p=0,0076$). Кроме того, для группы соединения (I) в низкой дозе и группы соединения (I) в высокой дозе доля образцов от животных, в которых в области восстановления имелось > 10 эритроцитсодержащих кровеносных сосудов, составляла 100% и 92,3% соответственно, то есть в обоих случаях она составляла не менее 90%. Результаты, приведенные выше, показывают, что соединение (I) в случае его применения в течение 28 дней подряд способно значительно увеличивать степень перфузии кровеносных сосудов в зоне восстановления после инфаркта головного мозга у животных с перенесенным инсультом (подробности см. в табл. 8).

Таблица 7. Сводные данные по восстановлению в каждой группе

Группа	Количество образцов		Доля образцов с хорошим восстановлением (%)
	Площадь восстановления $\leq 30\%$	Площадь восстановления $> 30\%$	
	Группа имитации хирургического вмешательства	-	12

(12)			
Модельная контрольная группа (N=17)	14	3	17,6
Группа NBP (N=14)	11	3	21,4
Группа соединения (I) в низкой дозе (N=12)	8	4	33,3
Группа соединения (I) в высокой дозе (N=12)	3	9**	75,0

Примечание. N - число животных в каждой группе для статистического анализа; ** означает, что p составляет $< 0,01$ при сравнении с модельной контрольной группой по критерию хи-квадрат.

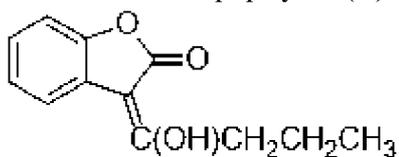
Таблица 8. Сводные данные по количеству кровеносных сосудов с перфузией в каждой группе

Группа	Количество кровеносных сосудов, содержащих эритроциты		Доля образцов, в которых имелось > 10 кровеносных сосудов, содержащих эритроциты (%)
	≤ 10	> 10	
Группа имитации хирургического вмешательства (12)	-	12	100
Модельная контрольная группа (N=17)	10	7	41,2
Группа NBP (N=15)	1	14**	93,3
Группа соединения (I) в низкой дозе (N=12)	0	12**	100
Группа соединения (I) в высокой дозе (N=13)	1	12**	92,3

Примечание. N - число животных в каждой группе для статистического анализа; ** означает, что p составляет $< 0,01$ при сравнении с модельной контрольной группой по критерию хи-квадрат.

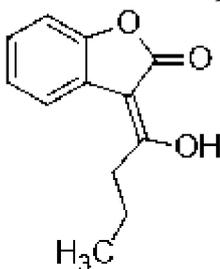
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемая соль:



(II)

2. Соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль:



(I)

3. Монокристалл соединения формулы (I), где монокристалл имеет следующие параметры элементарной ячейки:

Кристаллическая система	Моноклинная сингония
Пространственная группа	$P2_1/c$
$a/\text{Å}$	7,318(6)
$b/\text{Å}$	20,279(17)
$c/\text{Å}$	7,458(7)
$\alpha/^\circ$	90
$\beta/^\circ$	111,417(16)
$\gamma/^\circ$	90
Объем элементарной ячейки/ Å^3	1030,2(16)
Z	4

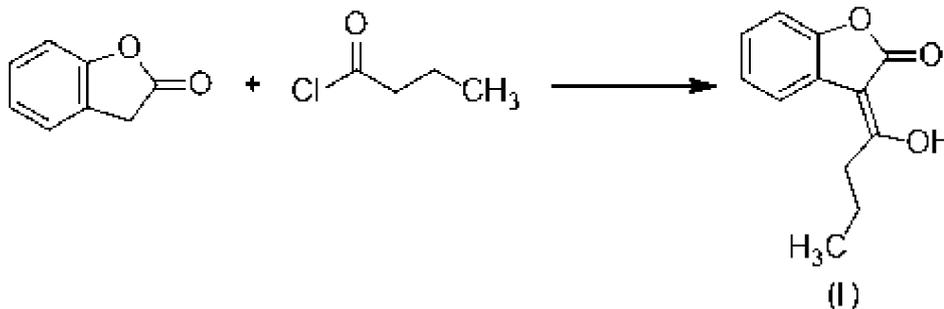
4. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль по п. 1, соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль по п. 2 или монокристалл по п. 3, а также один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

5. Применение соединения формулы (II) или его фармацевтически приемлемой соли по п. 1, соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли по п. 2, монокристалла по п. 3 или композиции по п. 4 для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения и/или профилактики заболеваний, связанных с ишемическим повреждением головного мозга.

6. Применение по п. 5, где заболевания, связанные с ишемическим повреждением головного мозга, включают ишемический церебральный инсульт, сосудистую деменцию,

посттравматическое воспаление, судороги и ишемическое повреждение или некроз нейронов.

7. Метод синтеза соединения формулы (II) и соединения формулы (I), где соединение формулы (I) предпочтительно получают следующим образом:



8. Метод получения монокристалла по п. 3, включающий растворение соединения формулы (I) по п. 2 в петролейном эфире, фильтрование, покрытие фильтрата пленкой с мелкими отверстиями и помещение фильтрата в вентилируемое помещение, что обеспечивает медленное испарение растворителя при комнатной температуре с образованием монокристалла.

По доверенности

1/1

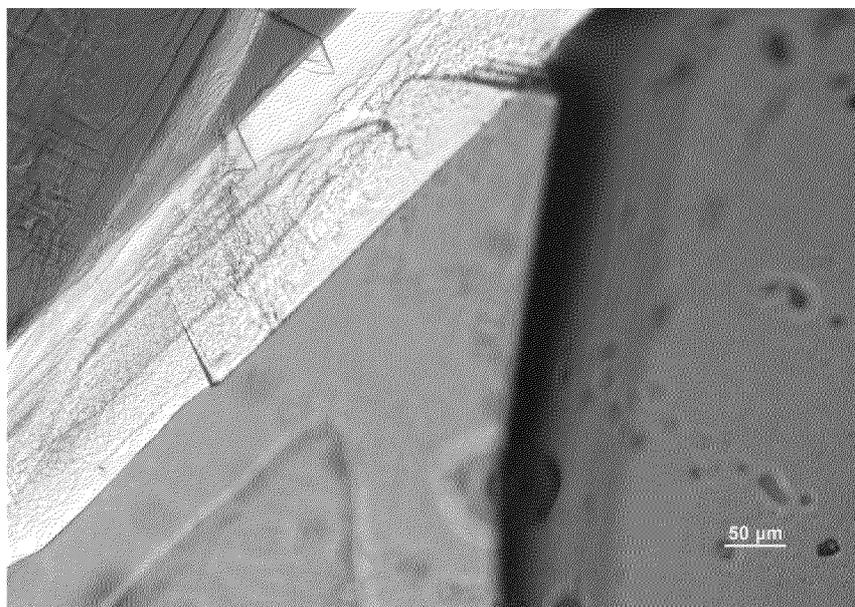


РИС. 1

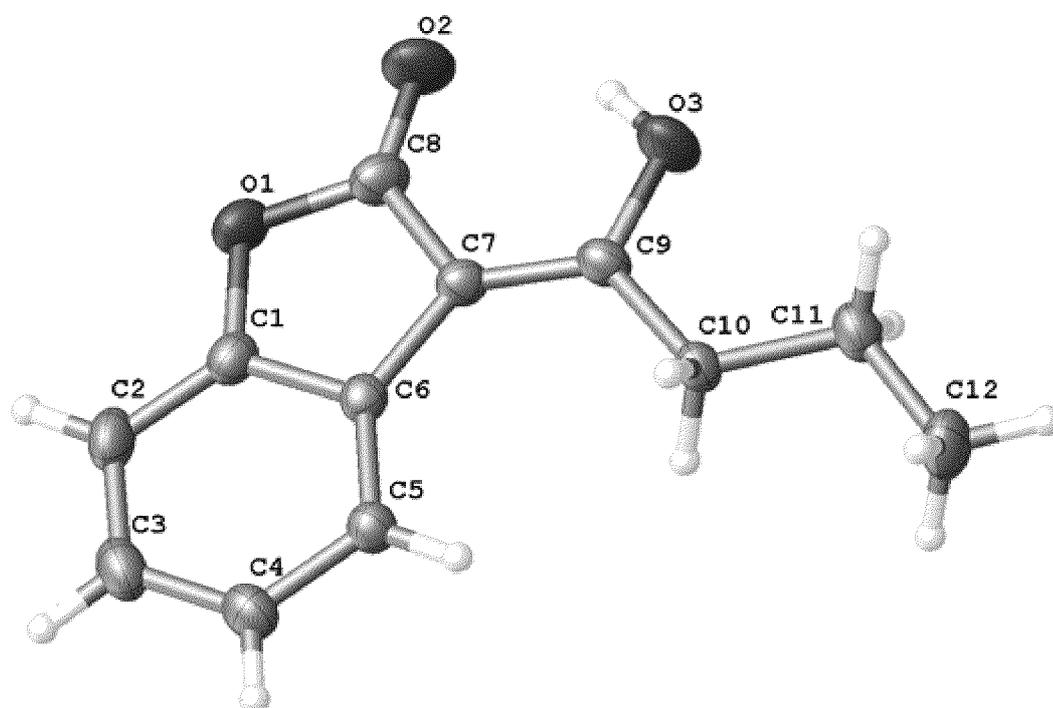


РИС. 2