

Область техники

Настоящее изобретение относится к новым производным 2-аминобензойной кислоты, содержащим их фармацевтическим композициям и применению данных соединений в производстве лекарственных средств для лечения или профилактики различных заболеваний.

Уровень техники

Настоящее изобретение, в целом, относится к новым соединениям, их применению в терапии, а также к содержащим их фармацевтическим композициям.

Аминокислота триптофан подвергается биологическим превращениям в ходе реакций «кинуренинового пути». (Beadle, G.W., Mitchell, H.K., and Nyc, J.F., Proc. Nat. Acad. SC, 33, 155 (1948); см Charles Heidelberger, Mary E. Gullberg, Agnes Fay Morgan, and Samuel Lepkovsky TRYPTOPHAN METABOLISM. I. CONCERNING THE MECHANISM OF THE MAMMALIAN CONVERSION OF TRYPTOPHAN INTO KYNURENINE, KYNURENIC ACID, AND NICOTINIC ACID. J. Biol. Chem. (1949) 179: 143-150 (Метаболизм триптофана. I. О механизме превращения триптофана в кинуренин, кинурениновую кислоту и никотиновую кислоту в организме млекопитающих). Более 95% поступающего в организм с пищей триптофана превращается в процессе метаболизма в кинуренины (Wolf, H. Studies on tryptophan metabolism in man (Исследование метаболизма триптофана у человека). Scand. J. Clin. Lab. Invest. 136 (suppl.): 1-186, 1974). В периферических тканях, особенно в печени, триптофан-диоксигеназа или индоламин 2,3-диоксигеназа модифицируют индольное кольцо триптофана, в результате чего образуется формилкинуренин. Затем кинуренин-формилаза быстро превращает формилкинуренин в L-кинуренин, который является ключевым соединением кинуренинового пути (W. Eugene Knox and Alan H. Mehler The conversion of tryptophan to kynurenine in liverl. The coupled tryptophan peroxidase-oxidase system forming formylkynurenine. J. Biol. Chem. (1950), 187:419-430 (Превращение триптофана в кинуренин в печени: I. Сопряженная пероксидаз-оксидазная система, превращающая триптофан в кинуренин)). L-кинуренин присутствует в низких концентрациях в крови, мозге, а также в периферических органах. Свободный транспорт L-кинуренина через гематоэнцефалический барьер осуществляет крупный переносчик нейтральных аминокислот. Три различных фермента отвечают за метаболические превращения L-кинуренина в тканях млекопитающих: кинуренин 3-гидроксилаза, которая образует 3-гидроксикинуренин (3-НК), кинурениназа, которая образует антраниловую кислоту, и кинуренин аминотрансфераза (КАТ), действие которой приводит к образованию кинуреновой кислоты. Метаболизм 3-гидроксикинуренина осуществляет либо та же КАТ с образованием ксантуреновой кислоты - метаболически инертного побочного продукта кинуренинового пути, либо кинурениназа. В последнем случае образуется 3-гидроксиантраниловая кислота, которая в конечном итоге превращается в хинолиновую кислоту. Наконец, фосфорибозилтрансфераза, субстратом которой является хинолиновая кислота, метаболизирует последнюю с образованием мононуклеотида никотиновой кислоты и продуктов последующей деградации, включая конечный продукт - НАД⁺.

И кинуреновая кислота, 3-гидроксикинурениновая кислота, и хинолиновая кислота являются нейроактивными промежуточными продуктами этого каскада катаболических реакций. 3-гидроксикинуренин является генератором свободных радикалов, образование которых, как было показано, является причиной начала апоптоза, потенцирования эксайтотоксичности (токсичности возбуждения), развития катаракты, нейродегенеративных заболеваний, инсульта, травмирующих поражений головного мозга, нейровирусных инфекций и нейровоспаления. Хинолиновая кислота является агонистом рецептора к N-метил-D-аспартату (NMDA), а также генератором свободных радикалов и, как таковая, может вызывать эксайтотоксичность, нейродегенеративные заболевания, инсульт, травматические повреждения головного мозга, эпилепсию, церебральную малярию, перинатальную гипоксию, нейровирусные заболевания и нейровоспаление. Эндогенная хинолиновая кислота может активировать рецепторы к NMDA и усиливать эксайтотоксичность и нейротоксичность, вызывая психологические и физиологические процессы, опосредуемые рецепторами к NMDA. Среди указанных трех нейроактивных кинуренинов наибольшее внимание в последнее время уделяют кинуреновой кислоте (KYNA). Впервые описанная два десятилетия назад как нейроингибирующее соединение KYNA в высоких, нефизиологических концентрациях является антагонистом широкого спектра действия ионотропных глутаматергических рецепторов. KYNA в высоких концентрациях обладает противосудорожным действием и обеспечивает прекрасную защиту от эксайтотоксических повреждений. В значительно более низких концентрациях KYNA действует как конкурентный блокатор сайта связывания коагониста глицина NMDA-рецептора и как неконкурентный ингибитор никотинового рецептора ацетилхолина $\alpha 7$. Тот факт, что аффинность KYNA к этим двум рецепторам, пропускающим ионы Ca^{2+} , лежит в пределах уровней KYNA в мозге человека и достаточно близка к (низкому) содержанию KYNA в мозге грызунов, предполагает физиологическую роль в глутаматергической и холинергической нейропередаче. Прямое подтверждение этого было получено, например, в результате исследований *in vivo* на стриатуме крыс, в котором снижение уровня KYNA повышает предрасположенность эксайтотоксическому инсульту и, наоборот, умеренное повышение уровня KYNA подавляет высвобождение глутамата (Schwarcz R., Pellicciari R. Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2002, 303:1-10).

Поскольку было сделано предположение, что кинуренины не только участвуют в патофизиологии нейродегенеративных и судорожных расстройств, но также играют роль в большом количестве разнообразных по этиологии заболеваний ЦНС, важно регулировать их образование. Авторы изобретения предполагают, что описанные здесь производные 2-аминобензойной кислоты (кинурениноподобные соединения) будут полезны в таком терапевтическом вмешательстве. Предполагаемый механизм действия может представлять собой, без ограничения, ингибирование ферментов кинуренинового пути, и/или ингибирование промежуточных соединений, и/или ингибирование процесса образования свободных радикалов.

Краткое описание изобретения

Данное изобретение относится к соединениям формулы



(I)

а также к их стереоизомерам и фармацевтически приемлемым солям, где

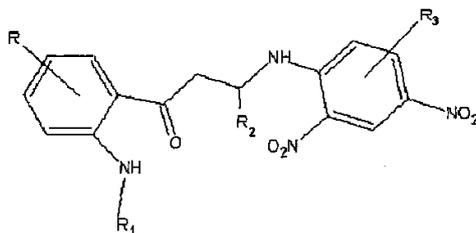
A представляет собой алкилен с числом атомов углерода от 1 до 6;

R, R₁ и R₂ независимо представляют собой атом водорода или галогена, галогеналкильную, арильную или гетероциклическую группу, гетероарильную группу, алкильную, алкенильную, алкинильную, арилалкильную, арилалкенильную, арилалкинильную или гидроксиалкильную группу, нитро-, amino-, циано- или цианамидогруппу, гуанидин-, амидино-, ациламино- или гидроксигруппу, тиоловую группу, ацилокси-, азидо- или алкоксигруппу, карбоксильную группу, карбониламиндогруппу, S-алкильную или алкилтиоловую группу;

X представляет собой алкилен >C₁₋₆, >C=O, или >C=S или простую связь;

Y представляет собой атом водорода или галогена, галогеналкильную, арильную или гетероциклическую группу, гетероарильную группу, алкильную, алкенильную, алкинильную, арилалкильную, арилалкенильную, арилалкинильную или гидроксиалкильную группу, нитро-, amino-, циано- или цианамидогруппу, гуанидин, амидино-, ациламино- или гидроксигруппу, тиоловую группу, ацилокси-, азидо- или алкоксигруппу, карбоксильную группу, карбониламиндогруппу, возможно замещенную по кольцу несколькими заместителями (вплоть до четырех), независимо выбранными из водорода, галогена, галогеналкильной, арильной или гетероциклической группы, гетероарильной группы, алкильной, алкенильной, алкинильной, арилалкильной, арилалкенильной, арилалкинильной или гидроксиалкильной группы, нитро-, amino-, циано- или цианамидогруппы, остатка гуанидина, амидино-, ациламино- или гидроксигруппы, тиоловой группы, ацилокси-, азидо- или алкоксигруппы, S-алкильной, алкилтиоловой группы или -COQ, где Q обозначает гидроксигруппу, алкоксигруппу с количеством атомов углерода от 1 до 6, аминогруппу, моноалкиламино группу с числом атомов углерода от 1 до 6, диалкиламиногруппу с числом атомов в алкилах от 1 до 6, гидроксиаминогруппу, алкоксиаминогруппу с числом атомов углерода от 1 до 4, арилC₁₋₄алкоксиаминогруппу, за исключением (а) соединений, в которых одновременно X представляет собой >C=O, Y представляет собой метил, A представляет собой CH₂CH₂, R представляет собой 5-метоксигруппу, R₁ представляет собой H или формил, а R₂ представляет собой H и (b) соединения, в которых фрагмент -A(R₂)-NH-X-Y представляет собой -CH₂CH(COQ)-NH₂ или -CH(галогеналкил)-CH(COQ)-NH₂.

Не ограничивая общую применимость соединений согласно данному изобретению, в подгруппу предпочтительных в настоящий момент соединений (формула (II)) можно выделить соединения, где R представляет собой атом водорода, метильную группу или метокси; R₁ представляет собой атом водорода или формил; R₂ представляет собой атом водорода или карбоксильную группу, а R₃ представляет собой атом водорода или галогена, галогеналкильную, арильную или гетероциклическую группу, гетероарильную группу, алкильную, алкенильную, алкинильную, арилалкильную, арилалкенильную, арилалкинильную или гидроксиалкильную группу, нитро-, amino-, циано- или цианамидогруппу, остаток гуанидина, амидино-, ациламино- или гидроксигруппу, тиоловую группу, ацилокси-, азидо- или алкоксигруппу, карбоксильную группу, карбониламиндогруппу, S-алкил или алкилтиол, а также их стереоизомеры и фармацевтически приемлемые соли



(II)

В другую подгруппу соединений согласно настоящему изобретению выделяют соединения формулы (I), где X представляет собой 2-фурил, 2-дигидрофурил, 2-тетрагидрофурил или (2-R^o-COO-)фенил, любой из которых может быть замещенным одним или двумя заместителями, выбранными из следующего ряда: алкил с числом атомов углерода от 1 до 4, алкоксигруппа с числом атомов углерода от 1 до 4, OH, нитрогруппа, а Y представляет собой атом водорода или остаток стирола, замещенный по кольцу одним или двумя заместителями, независимо выбранными из следующего ряда: атом галогена, алкил с числом атомов углерода от 1 до 4, алкоксигруппа с числом атомов углерода от 1 до 4, OH, нитрогруппа, арильная группа, арилC₁₋₄алкильная группа или арилC₁₋₄алкоксигруппа, а также стереоизомеры и фармацевтически приемлемые соли этих соединений.

Область охвата настоящего изобретения включает также фармацевтические композиции, содержащие в качестве активного вещества терапевтически эффективное количество соединения формулы (I), или его фармацевтически приемлемой соли, или любого из возможных изомеров либо смеси изомеров, отвечающих формуле (I), в сочетании с одним или более из фармацевтически приемлемых дилуэнтов, консервантов, солюбилизаторов, эмульгаторов, адъювантов, наполнителей и носителей, в частности из традиционных применяемых в фармацевтических и ветеринарных композициях. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно применять для назначения людям и/или животным.

Соединения формулы (I) полезны в лечении, и/или профилактике, и/или минимизации гибели нейронов, связанной с инсультом, ишемией, травмой ЦНС, гипогликемией и хирургическими вмешательствами, расстройствами ЦНС, включая нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, амиотрофический латеральный склероз, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона и синдром Дауна, в лечении и профилактике неблагоприятных последствий избыточного воздействия возбуждающих аминокислот, психиатрических расстройств, например нарушений сна, эпилепсии и других судорожных расстройств, тревоги, психоза, старческого слабоумия (деменции), мультиинфарктной деменции, хронической боли (аналгезии), глаукомы, ЦМВ-ретинита, недержания мочи, а также в обезболивании и улучшении когнитивных функций, в профилактике опиатной толерантности и симптомов прекращения приема наркотиков.

В настоящее время предполагают, что по мере изучения и объяснения некоторых состояний их также можно будет лечить путем введения соединений согласно настоящему изобретению. Такие состояния включают: импотенцию, сердечно-сосудистые расстройства, ограничение свертывания крови, противовоспалительные реакции, нейропатию, расстройства, в основе которых лежат нарушения нормальных биологических ритмов, например нарушение суточных ритмов в результате смены часового пояса, нарушения циркадных ритмов сна, такие как синдром задержки фазы сна, проблемы, связанные со сменностью работы, и сезонные нарушения, например сезонное аффективное расстройство (САР), показания со стороны эндокринной системы, например контрацепция и бесплодие, преждевременную половую зрелость, предменструальный синдром, гиперпролактинемия и дефицит гормона роста, неопластические заболевания, например рак и другие пролиферативные заболевания (доброкачественная и опухоль левая гиперплазия предстательной железы), иммунологические расстройства, включая СПИД, состояния, ассоциированные со старением, офтальмологические заболевания, приступообразную головную боль, мигрень, защиту кожи, стабилизацию диабета и расстройства, связанные с увеличением веса (лептин-опосредованные нарушения, ожирение), а также в качестве вспомогательного средства, применяемого в разведении животных, например при контроле фертильности, наступления половой зрелости, цвета шерсти.

Подробное описание изобретения

Не ограничивая общую применимость соединений согласно данному изобретению, в дополнение к уже упомянутым выше подгруппам, в еще одну группу предпочитаемых в настоящее время соединений можно выделить соединения формулы (I), в которой X представляет собой 2,4-динитрофенил; A представляет собой CH₂CH₂ или CH₂CHCOOH, а R₂ и Y представляют собой атомы водорода.

В другую подгруппу соединений согласно данному изобретению можно выделить соединения формулы (I), где R₂ представляет собой атом водорода, которые отвечают по меньшей мере одному из следующих условий: R представляет собой 5-метоксигруппу и/или A представляет собой CH₂CH₂ или CH₂CHCOOH, а в составе этих подгрупп R₁ также предпочтительно представляет собой атом водорода. Иллюстративные примеры комбинаций X и Y в соединениях согласно данному изобретению, в частности те, в которых R₁=H, приведены ниже:

X обозначает -CO-, а Y обозначает 2-фурил; или

X обозначает -CO-, а Y обозначает 2-тетрагидрофурил; или

X обозначает -CH₂-, а Y обозначает 2-тетрагидрофурил; или

X обозначает -CO-, а Y обозначает 2-ацетоксифенил; или

X обозначает -CO- а Y обозначает 3,4-дигидроксистирил или 3,4-дигидроксициннамоилоксигруппу.

Область охвата настоящего изобретения также включает фармацевтические композиции, содержащие в качестве активного агента терапевтически эффективное количество соединения формулы (I), или его фармацевтически приемлемой соли, или любого из возможных изомеров либо смеси изомеров, отвечающих формуле (I), в сочетании с одним или более из фармацевтически приемлемых дилуэнтов, консервантов, солюбилизаторов, эмульгаторов, адъювантов, наполнителей и носителей, в частности, тради-

ционно применяемых в фармацевтических и ветеринарных композициях. Данные фармацевтические композиции можно применять для назначения людям и/или животным.

Фармацевтическая композиция согласно данному изобретению предпочтительно характеризуется по меньшей мере одним из следующих признаков:

I. Композиция представлена в форме, пригодной для перорального, ректального, парентерального, трансбуккального введения, внутривенного введения (например, путем ингаляции) или чрескожного введения.

II. Композиция приготовлена в виде единичной лекарственной дозы, причем каждая единичная доза лекарственной формы содержит от 0,0025 до 1000 мг по меньшей мере одного из описанных соединений.

III. Композиция представляет собой форму с контролируемым высвобождением, из которой с заданной скоростью выделяется по меньшей мере одно из описанных соединений.

Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть представлены в форме, например, таблеток, капсул, эмульсий, растворов, сиропов или суспензий. Для парентерального введения композиции могут иметь форму, например, ампул, либо суспензий, растворов или эмульсий в водных или масляных разбавителях. Необходимость применения суспендирующего, стабилизирующего и/или диспергирующего вещества будет, безусловно, зависеть как от растворимости активных соединений в разбавителях, применяемых в конкретном способе реализации изобретения, так и от других факторов. Фармацевтические композиции могут дополнительно содержать, например, физиологически совместимые консерванты и антиоксиданты. В композициях для местного применения, например в кремах, лосьонах или пастах, активный компонент можно смешивать с традиционными жирными или эмульгирующими наполнителями.

Фармацевтические композиции можно также применять в форме суппозиториев с обычными основами для суппозиториев, такими как какао-масло или другие глицериды. В качестве альтернативы композиции можно выпускать в формах с пролонгированным действием, которые медленно высвобождают активный компонент в организм в течение заданного периода времени. Кроме того, соединения согласно настоящему изобретению можно вводить, применяя для этого системы для трансбуккальной, внутривенной или чрескожной доставки.

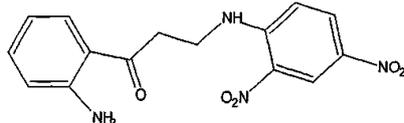
Также область охвата настоящего изобретения включает сочетания соединений формулы (I) и их солей с другими активными компонентами, в частности другими нейролептическими, тимолептическими, анксиолитическими средствами, транквилизаторами, анальгетиками, противопаркинсоническими лекарственными средствами (допаминергическими и недопаминергическими лекарственными средствами) и т.п.

Соединения согласно настоящему изобретению полезны в лечении, и/или профилактике, и/или минимизации гибели нейронов, связанной с инсультом, ишемией, травмой ЦНС, гипогликемией и хирургическими вмешательствами, расстройствами ЦНС, включая нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, амиотрофический латеральный склероз, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона и синдром Дауна; в лечении или профилактике неблагоприятных последствий избыточного воздействия возбуждающих аминокислот, психиатрических расстройств, например нарушений сна, эпилепсии и других судорожных расстройств, тревоги, психоза, старческого слабоумия (деменции), мультиинфарктной деменции, хронической боли (аналгезии), глаукомы, ЦМВ-ретинита, недержания мочи, а также при обезболивании, улучшении когнитивных функций и профилактики опиатной толерантности и симптомов прекращения приема наркотиков.

В настоящее время предполагают, что по мере изучения и объяснения некоторых состояний, они будут поддаваться лечению путем введения соединений согласно настоящему изобретению. Такие состояния включают импотенцию, сердечно-сосудистые расстройства, ограничение свертывания крови, противовоспалительные реакции, нейропатию, расстройства, в основе которых лежат нарушения нормальных биологических ритмов, например нарушение суточных ритмов в результате смены часового пояса, нарушения циркадных ритмов сна, такие как синдром задержки фазы сна, проблемы, связанные со сменностью работы и сезонные нарушения, например сезонное аффективное расстройство (САР), показания со стороны эндокринной системы, например контрацепция и бесплодие, преждевременная половая зрелость, предменструальный синдром, гиперпролактинемия и дефицит гормона роста, неопластические заболевания, включая, например, рак и другие пролиферативные заболевания (доброкачественная и опухоль гиперплазия предстательной железы), иммунологические расстройства, включая СПИД, состояния, ассоциированные со старением, офтальмологические заболевания, приступообразную головную боль, мигрень, защиту кожи, стабилизацию диабета и расстройства, связанные с увеличением веса (лептинопосредованные нарушения, ожирение), а также в качестве вспомогательного средства, применяемого в разведении животных, например при контроле фертильности, наступления половой зрелости, цвета шерсти.

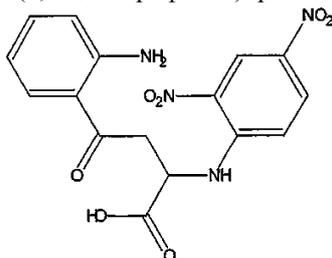
Изобретение будет проиллюстрировано следующими примерами. Эти примеры следует понимать исключительно как иллюстративные, они ни в коем случае не призваны ограничить область охвата данного изобретения.

Пример 1. 2-(Аминобензоил)-N-(2,4-динитрофенил)этиламин.



Во флаконе объемом 50 см³ растворяют кинурамин дигидробромид (2HBr) (125 мг) в 5 см³ чистого этилового спирта. Затем добавляют раствор 2,4-динитрофторбензола, 71 мг в 5 см³ этилового спирта (EtOH) с образованием прозрачного желтого раствора. Через 5 мин во флакон по каплям вводят 2 см³ 10% раствора NaHCO₃. Реакционную смесь оставляют при комнатной температуре на ночь. На следующее утро образовавшийся светло-желтый осадок фильтруют, промывают водой и этанолом и высушивают в сверхвысоком вакууме с получением в результате 80 мг продукта (выход примерно 63%).

Пример 2. 3-(2-Аминобензоил)-N-(2,4-динитрофенил)пропионовая кислота.



Во флаконе объемом 50 см³ растворяют L-кинурунин (125 мг) в 5 см³ чистого этилового спирта. Затем добавляют раствор 2,4-динитрофлуоробензола, 71 мг в 5 см³ этилового спирта (EtOH) с образованием прозрачного желтого раствора. Через 5 мин во флакон по каплям вводят 2 см³ 10% раствора NaHCO₃. Реакционную смесь оставляют при комнатной температуре на ночь. На следующее утро образовавшийся светло-желтый осадок фильтруют, промывают водой и этанолом и высушивают в сверхвысоком вакууме, получая в результате 80 мг продукта (выход примерно 71%).

Данное изобретение включает также фармацевтически приемлемые соли соединений формулы (I) и возможные изомеры, соответствующие формуле (I), как по отдельности, так и в смеси.

Биологическое тестирование соединений согласно изобретению

Эксперимент 1.

Оценка противопаркинсонической активности с использованием мышей, которых предварительно подвергли действию нейротоксина МРТР, с/без подпороговой дозы L-Dopa.

Животные.

Использовали самцов мышей C57 BL/6 в возрасте 6 месяцев, вес которых составлял 22-25 г. После доставки мышей в лабораторию им давали акклиматизироваться в течение двух недель в комнате с контролируемой температурой (21±1°C) и постоянным свето-темновым режимом (12 ч свет включен/12 ч - выключен, свет включен с 06:00 до 18:00). Мышам обеспечивали свободный доступ к воде и пище на протяжении всего периода акклиматизации. Мышей держали в группах по 12 особей и подвергли тестированию только в «светлые» часы (08:00-15:00). Каждую камеру для тестирования (т.е. клетку для тестирования двигательной активности) помещали в звуконепроницаемую деревянную коробку с толщиной стенок и передних панелей, равной 12 см. Каждая камера для тестирования имела приглушенное (тусклое) освещение.

Установка и измерения параметров поведения.

Для измерения спонтанной активности и/или вызванной препаратом двигательной активности мышей, подвергнутых действию МРТР, и мышей контрольной группы использовали автоматизированное приспособление, состоящее из клеток для тестирования грызунов (материал - macrolon, размеры - 40×25×15 см), каждую из которых пересекают две полосы инфракрасных лучей (на двух разных высотах: одна - «низкая», а вторая - «высокая», 2 и 8 см над поверхностью опилок (толщина слоя опилок - 1 см соответственно). Измеряли следующие параметры:

подвижность (локомоция) - измеряли при помощи нижней сетки инфракрасных лучей. Импульсы (отсчеты) регистрировали, только когда находящаяся на горизонтальной плоскости мышь перемещалась с места на место внутри клетки для тестирования;

стойки регистрировали на протяжении всего времени, когда хотя бы один из верхних лучей был пересечен мышью, т.е. число зарегистрированных импульсов было пропорционально времени, проведенному мышами в стойке;

общая активность - измеряли при помощи сенсора (звукосниматель наподобие граммофонной иглы, установленный на рычаге с противовесом), с которым клетка для тестирования находилась в постоянном контакте. Этот сенсор регистрировал любые вибрации от клетки для тестирования, производимые, например, передвижением и стойками, а также толчками, дрожью, царапаньем и грумингом.

Измерения параметров поведения (подвижность, стойки и общая активность).

Через 12 дней после инъекций МРТР (2×40 мг/кг, подкожно с интервалом 24 ч) мышам путем внутривенной инъекции вводили 2-(2-аминобензоил)-N-(2,4-динитрофенил)этиламин (0,3, 1, 3, 10 мг/кг) или разбавитель (10% ДМСО, 1% КМЦ) и немедленно после этого помещали в камеры для тестирования активности, где за их моторным поведением следили в течение 60 мин. Через 60 мин мышам путем подкожной инъекции вводили 5 мг/кг L-Дора, а затем вновь помещали в камеры для тестирования и продолжали измерения активности в течение еще 240 мин. Интервал перед введением каждой дозы составлял два дня, начиная с минимальной дозы.

В табл. 1 представлены средние значения (\pm стандартное отклонение) для передвижения, стоек и общей активности мышей, которых подвергли действию МРТР, и мышей контрольной группы, которым вводили либо 2-(2-аминобензоил)-N-(2,4-динитрофенил)этиламин, либо разбавитель с подпороговой дозой L-Дора. Звездочкой обозначен 1% уровень значимости (критерий достоверно значимой разности Тьюки).

Таблица 1

ВВЕДЕННЫЕ ВЕЩЕСТВА	ПОДВИЖНОСТЬ	СТОЙКИ	ОБЩАЯ АКТИВНОСТЬ
Разбавитель	1000±145	920±181	10937±2812
МРТР+ разбавитель	200±90	225±72	4530±937
МРТР+0.3 мг/кг 2-(2-аминобензоил)-N-(2,4-динитрофенил)этиламина	273±64	290±73	5160±1093
МРТР+1 мг/кг 2-(2-аминобензоил)-N-(2,4-динитрофенил)этиламина	473±108*	582±145*	6250±625*
МРТР+3 мг/кг 2-(2-аминобензоил)-N-(2,4-динитрофенил)этиламина	510±107*	731 ±110*	6563±781*
МРТР+10 мг/кг 2-(2-аминобензоил)-N-(2,4-динитрофенил)этиламина	470±110*	619±102*	6250±625*

В первые 60 мин до введения L-Дора 2-(2-аминобензоил)-N-(2,4-динитрофенил)этиламин в любой дозе не оказывал никакого воздействия по сравнению с мышами, которым вводили МРТР и разбавитель. Однако при совместном введении с подпороговой дозой L-Дора 2-(2-аминобензоил)-N-(2,4-динитрофенил)этиламин значительно улучшил все три параметра поведения. 2-(2-Аминобензоил)-N-(2,4-динитрофенил)этиламин (1, 3, 10 мг/кг) значительно улучшил передвижение, стойки и общую активность мышей, которым вводили МРТР, по сравнению с группой мышей, которым вводили МРТР и разбавитель.

Введение 2-(2-аминобензоил)-N-(2,4-динитрофенил)этиламина контрольным животным (которым предварительно вводили только разбавитель) не оказало влияния ни на одну из переменных.

Эксперимент 2.

Определение электрофизиологических характеристик NMDA-активируемых токов в свежесыведенных нейронах гиппокампа крысы.

Выделение нейронов гиппокампа.

Крыс Wistar (12-14 дней) умерщвляли декапитацией без анестезии и отделяли гиппокамп. Вручную делали тонкие (0.2-0.4 мм) срезы гиппокампа в растворе, содержащем (мМ): 150 NaCl, 5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 20 глюкозы. Срезы инкубировали в этом растворе в течение 30 мин перед обработкой ферментами. Обработку ферментами проводили в том же растворе с более низкой концентрацией Ca₂⁺ (0,5 мМ), содержащем 0.4 мг/мл протеазы гриба *aspergillus oryzae*. Инкубацию в растворе фермента проводили при 32°C в течение 10 мин. Затем срезы выдерживали в растворе без фермента с нормальной концентрацией Ca₂⁺ и использовали не позднее 6-8 ч для получения изолированных нейронов. На протяжении всей процедуры растворы непрерывно насыщали газовой смесью, содержащей 95% O₂ и 5% CO₂, с целью поддержания pH 7,4. Для разделения клеток срезы переносили во внеклеточный раствор, содержащий (мМ) 150 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 20 N-2-дигидроэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновую кислоту (Nepes); pH доводили до значения 7,4 при помощи NaOH. Отдельные клетки выделяли из зон CA и CA3 срезов гиппокампа методом вибродиссоциации. Их диаметр составлял 10-15 мкм и они сохраняли небольшую часть дендритного дерева. После выделения они обычно были

пригодны для снятия сигналов в течение 1-2 ч.

Растворы и реагенты.

Состав внеклеточного раствора следующий (мМ): 130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 20 N-2-дигидро-этилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота (Nespes); 0.1 мкМ ТТХ (тетродотоксин), 10 мкМ глицина 200 мкМ L-аспартата, рН довели до значения 7,4 при помощи NaOH.

Состав внутриклеточного раствора был следующий (мМ): 110 CSF, 20 Tris-HCl (рН 7,2). Растворы L-аспартата и глицина готовили в день проведения эксперимента.

Исследуемое вещество 2-(2-аминобензоил)-N-(2,4-динитрофенил)этиламин растворяли в ДМСО.

Регистрация токов и анализ данных.

Содержащий лекарственное вещество раствор наносили быстрым точечным методом («concentration clamp»), используя установку «jumping table» (Фарма-Робот, Киев). Токи регистрировали по методике точечной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации «интактная клетка» (whole cell). Токи регистрировали при помощи усилителя ЕРС-7 L/M для пэтч-клампа.

NMDA-активируемые токи.

Сигналы для NMDA-активируемых токов пропускали через активный трехполосный фильтр Бесселя (3 кГц), оцифровывали (6000 мкс/точка). NMDA-активированные трансмембранные токи измеряли в присутствии 10 мкМ глицина и 300 мкМ L-аспартата в контрольном и исследуемом растворе. При регистрации токов значение потенциала поддерживали на уровне -70 мВ.

Расчеты.

Брали среднее значение подавления тока при разных концентрациях изучаемого вещества по меньшей мере в четырех клетках. Эффект воздействия вещества измеряли как среднее отношение I/I₀, где I - ток под действием исследуемого вещества, а I₀ - ток в контрольных условиях. S.D. обозначает стандартное отклонение.

Действие 10 мкМ 2-(2-аминобензоил)-N-(2,4-динитрофенил)этиламина на NMDA-активируемые токи показано в табл. 2.

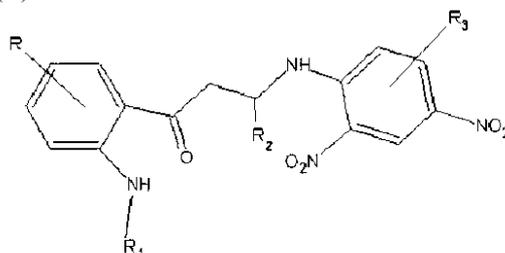
Таблица 2

2-(2-аминобензоил)-N-(2,4-динитрофенил)этиламин	I/I ₀ для отдельных клеток				±SD
	1	2	3	среднее	
	92,77	77,15	80,17	83,36	8,28

Этот эксперимент позволил обнаружить, что 2-(2-аминобензоил)-N-(2,4-динитрофенил)этиламин оказывает блокирующее воздействие на NMDA-рецепторы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (II)



(II)

где R представляет собой водород, метил или метокси, R₁ представляет собой водород или формил, R₂ представляет собой водород или карбоксил и R₃ представляет собой водород, галоген, галогенC₁₋₄алкил, фенил, C₁₋₄алкил, C₂₋₄алкенил, C₂₋₄алкинил, фенилC₁₋₄алкил, фенилC₂₋₄алкенил, фенилC₂₋₄алкинил, гидроксигруппу, тиоловую, C₁₋₄ацилокси-, азидо-, C₁₋₄алкоксигруппу, карбоксильную группу, карбониламиногруппу, S-C₁₋₄алкил или C₁₋₄алкилтиоловую группу; и его стереоизомеры и фармацевтически приемлемые соли.

2. Соединение по п.1, которое представляет собой 3-(2-аминобензоил)-2-(2,4-динитроанилино)пропионовую кислоту, а также его стереоизомеры и фармацевтически приемлемые соли.

3. Соединение по п.1, которое представляет собой 2-(2-аминобензоил)-N-(2,4-динитрофенил)этиламин и его фармацевтически приемлемые соли.

4. Фармацевтическая композиция, которая содержит терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного из соединений по п.1 в сочетании по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым компонентом, выбранным из дилуентов, консервантов, солюбилизаторов, эмульгаторов, адью-

вантов, наполнителей и носителей.

5. Фармацевтическая композиция по п.4, дополнительно характеризующаяся по меньшей мере одним из следующих признаков:

(i) указанная композиция пригодна для перорального, ректального, парентерального, трансбуккального введения, внутривенного или интратекального введения;

(ii) указанная композиция имеет форму единичной лекарственной дозы, причем каждая единичная лекарственная доза содержит от 0,0025 до 1000 мг по меньшей мере одного из указанных соединений;

(iii) указанная композиция имеет форму композиции с контролируемым высвобождением, из которой по меньшей мере одно из указанных соединений выделяется с заранее заданной скоростью;

(iv) указанная композиция дополнительно содержит по меньшей мере один из известных активных компонентов, выбранный из нейролептических, тимолептических, анксиолитических средств, транквилизаторов, анальгетических или противопаркинсонических средств.

6. Способ лечения болезни Паркинсона, включающий введение пациенту соединения по любому из пп.1-3 или фармацевтической композиции по п.4 или 5.

