

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11)

017915

(13)

B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации
и выдачи патента: **2013.04.30**

(21) Номер заявки: **200870232**

(22) Дата подачи: **2007.02.02**

(51) Int. Cl. **A61K 31/136** (2006.01)
A61K 31/167 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01)

(54) KСNQ-ОТКРЫВАТЕЛИ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ОСЛАБЛЕНИЯ СИМПТОМОВ ШИЗОФРЕНИИ

(31) PA200600175

(32) 2006.02.07

(33) DK

(43) 2009.02.27

(86) PCT/DK2007/050013

(87) WO 2007/090409 2007.08.16

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
Х. ЛУНДБЕКК А/С (DK)

(72) Изобретатель:

**Хусум Бак-Енсен Хенриетте, Венсель
Торнее Кристиан, Роттлендер Марио,
Греве Даниель Родригез, Ханжин Николай,
Ритзен Андреас, Уотсон Уильям Патрик
(DK)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A-2004080950

WO-A-2005087754

WO-A-2004060880

US-A1-2004106621

WO-A-02062295

WO-A-2005025293

HANSEN, H.H. ET AL.: "The KCNQ Channel Opener Retigabine Inhibits the Activity of Mesencephalic Dopaminergic Systems of the Rat". THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, vol. 318, no. 3, September 2006 (2006-09), pages 1006-1019, XP009084511, USA, the whole document, abstract, page 1018, right-hand column, last paragraph

(57) Изобретение относится к применению селективных открывателей калиевых KCNQ-каналов для получения фармацевтической композиции для лечения шизофрении или ослабления симптомов шизофрении и симптомов родственных расстройств и заболеваний. Более конкретно, изобретение относится к применению соединения для получения фармацевтической композиции для лечения или ослабления симптомов шизофрении, где соединение выбрано из группы, состоящей из этилового эфира N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты; 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамида; N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамида; N-(4,6-диметил-2-морфолин-4-илпиримидин-5-ил)-2-(4-фторфенил)ацетамида; (2,6-дифтор-4-морфолин-4-илфенил)амида гексановой кислоты; 2-циклопентил-N-(4,6-диметил-2-морфолин-4-илпиримидин-5-ил)ацетамида; N-(2-бром-4-морфолин-4-ил-6-трифторметилфенил)пропионамида; N-(2,4-диметил-6-морфолин-4-илпиримидин-3-ил)-3,3-диметилбутирамида; этилового эфира [2-амино-4-(2,4,6-триметилбензиламино)фенил]карбаминовой кислоты и 2-циклопентил-N-(2-метокси-6-метил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамида, или его фармацевтически приемлемой соли.

B1**017915****017915****B1**

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новому способу лечения шизофрении или ослабления симптомов шизофрении, где указанный способ включает введение хозяину, нуждающемуся в этом, эффективно-го количества соединения, способного селективно увеличивать поток ионов через калиевые KCNQ-каналы. Кроме того, настоящее изобретение относится к использованию селективных открывателей калиевых KCNQ-каналов для получения фармацевтической композиции для лечения шизофрении или ослабления симптомов шизофрении и симптомов родственных расстройств и заболеваний. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу скрининга соединений, которые являются селективными открывателями калиевых KCNQ-каналов и которые обладают антипсихотическим потенциалом.

Предшествующий уровень техники

Известно, что при шизофрении и при родственных расстройствах допаминергическая система разрушается (Meltzer and Stahl Schizophrenia Bulletin, 1976, 2, 19-76) и все соединения, применяемые в настоящее время для лечения шизофрении, обладают способностью модулировать допаминергическую систему. Эти соединения действуют как ингибиторы передачи сигнала ряда рецепторов, экспрессируемых в головном мозге, в частности допаминового рецептора D2. Однако важную роль в продуцировании активности многих антипсихотических лекарственных средств также играют и другие рецепторы, включая серотонергические, норадренергические, гистаминергические и мускариновые рецепторы (Scolnick, Schizophrenia Bulletin, 2004, 72, 75-77).

Все современные антипсихотические соединения, помимо своей способности ослаблять симптомы шизофрении и родственных расстройств, продуцируют ряд побочных эффектов. Природа таких побочных эффектов зависит от конкретно рассматриваемых фармакологических свойств данного соединения. Все применяемые в медицине антипсихотические средства ингибируют допаминовый рецептор D2 в той или иной степени (Seeman et al., Nature, 261, 717-719). Соединения, которые требуют высокого уровня блокады допаминового рецептора D2, например галоперидол, вызывают экстрапирамидальные побочные эффекты и повышают уровни пролактина. Экстрапирамидальными побочными эффектами являются паркинсонизм, ригидность, акинезия, а после продолжительного лечения этими соединениями может развиваться поздняя дискинезия (Pierre, Drug Safety, 2005, 28, 191-208). Увеличение уровней пролактина может вызывать различные нарушения эндокринной системы, такие как гинекомастия, галакторея, сексуальная дисфункция, бесплодие, олигоменорея и аменорея (Haddad and Wieck Drugs, 2004, 64, 2291-2314).

Современные антипсихотические соединения, в частности новый класс нестандартных антипсихотических средств, таких как оланзапин, кветиапин и рисперидон, также ассоциируются с инсулинорезистентностью, нарушением метаболизма глюкозы и липидов, диабетом и избыточным весом (Melkersson and Dahl, Drugs, 2004, 64, 701-723).

Кроме того, современные антипсихотические средства могут вызывать "заторможенность мышления", которая способствует развитию когнитивных симптомов шизофрении. Кроме того, некоторые антипсихотические средства могут также вызывать ангедонию, подавленное настроение и, очевидно, обострение негативных симптомов шизофрении (Heinz et al., Schizophrenia Research, 1998, 31, 19-26).

Современные антипсихотические средства также оказывают неадекватное действие на симптомы шизофрении. Симптомы шизофрении подразделяются на три широкие категории: позитивные, негативные и когнитивные. Позитивными симптомами являются симптомы, вызывающие "искажение" нормального восприятия действительности, такие как галлюцинации и бред. Негативными симптомами являются симптомы, при которых у пациента отсутствует нормальное восприятие действительности, такие как ангедония и нарушение социальной адаптации. Когнитивные симптомы шизофрении ассоциируются с дефицитом познавательных способностей, таким как неспособность сконцентрировать внимание в течение длительного периода времени и неспособность принимать решения. Современные антипсихотические средства используют, главным образом, для ослабления позитивных симптомов шизофрении, однако для лечения негативных или когнитивных симптомов эти средства почти неэффективны (Mishara & Goldberg, Biological Psychiatry, 2004, 55, 1013-1022). Кроме того, клинический эффект при приеме антипсихотических средств наблюдается через несколько недель после начала лечения. В недавно проводимых крупномасштабных сравнительных исследованиях (в исследовании CATIE) с участием человека приблизительно 30-40% пациентов прерывали лечение (переходили на прием других лекарственных средств) из-за отсутствия его эффективности (Lieberman et al. New England Journal Of Medicine, 2005, 353, 1209-1223).

Тяжелое депрессивное расстройство представляет собой хроническое рецидивирующее заболевание, и его распространенность среди всего населения является чрезвычайно высокой. Главным признаком этого заболевания является подавленное настроение. Клиническая картина указанного заболевания также характеризуется симптомами ангедонии, нарушением сна, психомоторным возбуждением или заторможенностью, сексуальной дисфункцией, потерей веса, неспособностью к концентрации внимания и бредовыми идеями. Однако наиболее серьезными осложнениями приступов депрессии является формирование суицидальных мыслей, приводящее к попыткам самоубийства (DSM IV, American Psychiatric Association, Washington D.C. 1994).

Следовательно, целями, преследуемыми при лечении депрессии, являются эффективное ослабление симптомов депрессии, безопасность и хорошая переносимость лечения, а также достижение ряда терапевтических эффектов за короткий промежуток времени.

Биполярное расстройство, ранее называемое маниакально-депрессивным психозом, характеризуется депрессивными и маниакальными состояниями (типа I) или приступами депрессии и гипоманий (типа II). Симптомы биполярного депрессивного состояния не отличаются от симптомов, характеризующих состояние тяжелой депрессии. Этим можно также объяснить, почему многим пациентам с биполярным психозом вначале ставят диагноз тяжелой депрессии. Однако затем у таких пациентов появляются приступы маниакального или гипоманиакального психоза, которые позволяют установить диагноз биполярного расстройства. Биполярные расстройства характеризуются как состояния, представляющие угрозу для жизни, поскольку, по оценкам специалистов, у пациентов с диагностированным биполярным расстройством риск самоубийства в 15 раз выше, чем это наблюдается среди населения в целом (Harris and Barraclough, 1997, *British Journal of Psychiatry*, 170: 205-228). В настоящее время биполярное расстройство лечат путем введения пациентам с биполярным расстройством средств, стабилизирующих настроение (главным образом, лития или антиэпилептических средств), а в случае, если у пациентов наблюдаются рецидивы приступов маниакальных или депрессивных психозов, то добавляют, соответственно, средства аниманиакального действия (литий или антипсихотические средства) или антидепрессанты (трициклические антидепрессанты или селективные ингибиторы поглощения серотонина) (Liebermann and Goodwin, *Curr. Psychiatry Rep.* 2004, 6: 459-65). Таким образом, необходимо разработать новые схемы терапевтического лечения биполярного расстройства, которые позволяли бы проводить эффективное лечение психотических расстройств с симптомами всех трех основных категорий с использованием только одного терапевтического средства, при этом новое средство должно быстро ослаблять симптомы маниакальных расстройств (обладать аниманиакальной активностью), быстро ослаблять симптомы депрессии (обладать антидепрессантной активностью), предупреждать рецидивы маниакальных расстройств, а также возникновение симптомов депрессии (обладать активностью, стабилизирующей настроение).

Ионные каналы представляют собой клеточные белки, которые регулируют поток ионов как в клетки, так и из клеток, включая ионы калия, кальция, хлорида и натрия. Такие каналы присутствуют во всех клетках животных и человека и влияют на различные процессы, включая нейротрансмиссию, сокращение мышц и клеточную секрецию.

У человека имеется свыше 70 генов, кодирующих калиевые каналы различных подтипов (Jentsch *Nature Reviews Neuroscience*, 2000, 1, 21-30) с высокой степенью структурной и функциональной вариативности. Нейронные калиевые каналы, обнаруженные в головном мозге, ответственны, главным образом, за поддержание отрицательного мембранного потенциала покоя, а также за регуляцию реполяризации мембраны после возникновения потенциала действия.

Одной из субсерий генов калиевых каналов являются гены семейства KCNQ. Было показано, что мутации в четырех из пяти генов KCNQ приводят к развитию различных заболеваний, включая сердечную аритмию, глухоту и эпилепсию (Jentsch *Nature Reviews Neuroscience*, 2000, 1, 21-30).

KCNQ1 (KvLQT1) подвергается сборке вместе с продуктом гена KCNE1 (минимального белка K(+)-каналов), присутствующим в сердце, в результате чего в сердце возникает K(+)-ток, подобный задержанному выпрямленному току. Мутации в этом канале могут приводить к возникновению одной из форм наследственного синдрома, характеризующегося длительным интервалом QT типа 1 (LQT1), а также ассоциироваться с развитием глухоты (Robbins *Pharmacol. Ther.* 2001, 90, 1-19).

Гены KCNQ2 и KCNQ3 были обнаружены в 1998 году и оказалось, что при наследственной форме эпилепсии, известной как наследственная эпилепсия новорожденных с благоприятным течением (Rogawski *Trends in Neurosciences*, 2000, 23, 393-398), эти гены являются мутированными. Белки, кодируемые генами KCNQ2 и KCNQ3, находятся в пирамидальных нейронах коры головного мозга и гиппокампа человека, т.е. в областях головного мозга, ответственных за возникновение и распространение эпилептических припадков (Cooper et al. *Proceedings National Academy of Science USA*, 2000, 97, 4914-4919).

KCNQ2 и KCNQ3 представляют собой две субъединицы калиевых каналов, образующих "M-токи", при их экспрессии *in vitro*. Было также обнаружено, что KCNQ5 участвует в генерировании M-тока в культивируемых нейронах гиппокампа (Shah et al., *Journal of Physiology* 2002, 544, 29-37). Было обнаружено, что калиевые KCNQ4-каналы, при их экспрессии в клеточных линиях, обладают свойствами, подобными M-току (Søgaard et al., *American Journal of Physiology and Cellular Physiology*, 2001, 280, C859-C866). M-ток представляет собой не инактивирующий калиевый ток, обнаруживаемый в нейронах многих типов. В клетках каждого из этих типов M-ток является доминантным при модуляции возбудимости мембраны и продолжается лишь во время инициации потенциала действия (Marrion *Annual Review Physiology*, 1997, 59, 483-504). Модуляция M-тока оказывает большое влияние на возбудимость нейронов, например активация этого тока может снижать возбудимость нейронов. Открыватели таких KCNQ-каналов или активаторы M-тока могут снижать активность нейронов, а поэтому они могут быть использованы для лечения эпилепсии и других заболеваний и расстройств, характеризующихся избыточной нейронной активностью, такой как гипервозбудимость нейронов, включая судорожные синдромы, эпи-

лепсию, нейропатическую боль, тревожные состояния и шизофрению.

Считается, что ген KCNQ4 кодирует молекулярный коррелят калиевых каналов, обнаруживаемых во внешних волосковых клетках улитки внутреннего уха и в волосковых клетках типа I вестибулярного аппарата, в которых мутации могут приводить к развитию наследственной глухоты.

KCNQ2 и KCNQ4 также экспрессируются в черном веществе и в области вентральной покрышки (Kharkovets et al., 2000, Proceedings National Academy of Science USA, 97, 4333-4338), которые содержат клеточные тельца двух основных допаминергических систем головного мозга, т.е. систем черного вещества, эфферентно связанного с полосатым телом, и мезолимбических систем соответственно. При экспрессии в ооцитах или в клетках SH-SY5Y была обнаружена функциональная взаимосвязь между допаминовыми рецепторами D2 и KCNQ4-каналами (Ljungstrom et al., European Journal of Physiology, 2003, 446, 684-694), что дает основание предполагать, что аналогичная взаимосвязь существует *in vivo* при экспрессии рецептора D2 и KCNQ4-каналов в тех же самых клетках.

Ретигабин (D-23129; этиловый эфир N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты) и его аналого описаны в EP 554543. Ретигабин представляет собой противосудорожное средство, обладающее широким спектром действия и сильной противосудорожной активностью как *in vitro*, так и *in vivo*. Это средство является активным после его перорального и внутривенного введения крысам и мышам в тестах на противосудорожную активность (Rostock et al. Epilepsy Research, 1996, 23, 211-223). В недавно проводимых клинических испытаниях ретигабин обнаруживал эффективность в снижении частоты возникновения эпилептических припадков у пациентов с эпилепсией (Bialer et al. Epilepsy Research, 2002, 51, 31-71).

WO 2005/87754 раскрывает следующие соединения:

2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид;

N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамид;

(2,6-дифтор-4-морфолин-4-илфенил)амид гексановой кислоты;

N-(2-бром-4-морфолин-4-ил-6-трифторметилфенил)пропионамид и

2-циклопентил-N-(2-метокси-6-метил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид.

WO 2006/092143 раскрывает N-(2,4-диметил-6-морфолин-4-илпиридин-3-ил)-3,3-диметилбутирамид.

WO 2007/65449 раскрывает N-(4,6-диметил-2-морфолин-4-илпиримидин-5-ил)-2-(4-фторфенил)-ацетамид.

Было обнаружено, что ретигабин активизирует K(+)-ток в нейронах, и фармакологические свойства этого индуцированного тока соответствуют их описанию в опубликованных фармакологических работах, посвященных M-каналам. Было также показано, что ретигабин связывается с KCNQ-каналами (Wuttke et al., Molecular Pharmacology, 2005, 67, 1009-1017). Полученные данные дают основание предположить, что противосудорожная активность этого средства по меньшей мере отчасти обусловлена его способностью активировать KCNQ-каналы (Wickenden et al. Molecular Pharmacology, 2000, 58, 591-600) и что могут быть использованы и другие средства, действующие по тому же самому механизму.

Было показано, что ретигабин подавляет инициацию допаминергических нейронов в области вентральной покрышки *ex vivo* (Hansen et al., Society for Neuroscience Abstracts, 2005, 153.11). Однако неизвестно, приводит ли действие ретигабина к ингибированию допаминергических нейронов в области вентральной покрышки *in vivo*, а также неизвестно, ассоциируется ли этот эффект с его антипсихотической активностью у животных.

Поэтому в настоящее время остается крайне актуальной необходимость в получении соединений, которые были бы эффективными при лечении симптомов шизофрении и родственных заболеваний и расстройств, но при этом вызывали бы минимальные побочные эффекты или вообще не имели бы побочных эффектов, обычно ассоциированных с применением психотропных средств, а именно экстрапирамидальных побочных эффектов, увеличения уровня пролактина, увеличения массы тела, нарушения метаболизма глюкозы и сердечно-сосудистых расстройств. Кроме того, крайне необходимо получить соединения быстрого начала действия, которые были бы эффективными при лечении шизофрении и родственных заболеваний и расстройств. Более того, существует также крайняя необходимость в получении соединений, которые обладали бы значительно более высокой эффективностью в ослаблении позитивных, негативных и когнитивных симптомов шизофрении и которые могли бы быть использованы для лечения большего числа пациентов, чем это может быть осуществлено с применением уже существующих антипсихотических лекарственных средств. Кроме того, крайне необходимо разработать такой курс лечения, который был бы более удобным для его соблюдения пациентом.

Впервые было неожиданно обнаружено, что соединения, активирующие KCNQ-каналы, способны модулировать допаминергическую систему *in vivo* и являются эффективными при их введении животным, обычно используемым в качестве модели шизофрении.

Краткое описание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к применению соединения для получения фармацевтической композиции для лечения или ослабления симптомов шизофрении, где соединение выбрано из группы, состоящей из

этилового эфира N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты;
 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамида;
 N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамида;
 N-(4,6-диметил-2-морфолин-4-илпиримидин-5-ил)-2-(4-фторфенил)ацетамида;
 (2,6-дифтор-4-морфолин-4-илфенил)амида гексановой кислоты;
 2-циклопентил-N-(4,6-диметил-2-морфолин-4-илпиримидин-5-ил)ацетамида;
 N-(2-бром-4-морфолин-4-ил-6-трифторметилфенил)пропионамида;
 N-(2,4-диметил-6-морфолин-4-илпиримидин-3-ил)-3,3-диметилбутирамида;
 этилового эфира [2-амино-4-(2,4,6-триметилбензиламино)фенил]карбаминовой кислоты и
 2-циклопентил-N-(2-метокси-6-метил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамида
 или его фармацевтически приемлемой соли.

Подробное описание изобретения

Фармакологический профиль соединений согласно изобретению в высокой степени отличается от фармакологического профиля известных антипсихотических соединений, а поэтому предполагается, что указанные лекарственные средства не будут индуцировать побочные эффекты. Кроме того, соединения, которые активируют KCNQ-каналы, могут обладать быстрым началом действия. Более того, другой и новый механизм действия может быть гораздо более эффективным для устранения позитивных, негативных и когнитивных симптомов шизофрении и позволит проводить эффективное лечение большего процента пациентов, чем это может быть осуществлено с применением современных антипсихотических лекарственных средств. Кроме того, может быть разработан более удобный для пациента режим лечения. Соединения, которые активируют KCNQ-каналы, могут также давать лучший эффект при лечении депрессии или биполярного расстройства. Поэтому получение таких лекарственных средств является значительным достижением в области разработки способов лечения шизофрении, депрессии, биполярного расстройства и родственных заболеваний и расстройств.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к применению соединения для получения фармацевтической композиции для ослабления позитивных симптомов шизофрении, где указанные позитивные симптомы охватывают спектр психотических признаков, включая, но не ограничиваясь ими, одно или несколько таких проявлений, как галлюцинации (обычно слуховые), бред, расстройства мышления, искажение или ухудшение речи и общения, бессвязная речь, неадекватное поведение, кататоническое поведение и возбуждение.

В другом своем варианте настоящее изобретение относится к применению соединения для получения фармацевтической композиции для ослабления негативных симптомов шизофрении, где указанные негативные симптомы обычно означают синдром, который характеризуется одним или несколькими проявлениями, но не ограничиваются ими, притупленность эмоциональных реакций, афазия, нарушение социальной адаптации, ангедония (неспособность ощущать наслаждение), безволие (неспособность к целеустремленным действиям), потеря эмоционального восприятия окружающей действительности, неспособность к абстрактному мышлению, отсутствие непосредственности поведения, стереотипное мышление, алогия (замедление и нарушение продуктивности мышления и речи) и расстройство внимания.

В еще одном своем варианте настоящее изобретение относится к применению соединения для получения фармацевтической композиции для ослабления когнитивных симптомов шизофрении, где указанные когнитивные симптомы означают, но не ограничиваются ими, нарушение многих форм познавательной деятельности, включая внимание, память и исполнительные функции.

В еще одном своем варианте настоящее изобретение относится к применению соединения для получения фармацевтической композиции для ослабления позитивных, негативных или когнитивных симптомов шизофрении.

В еще одном своем варианте настоящее изобретение относится к применению соединения для получения фармацевтической композиции для ослабления симптомов шизофрении, где симптомы шизофрении одного или нескольких подтипов выбраны из группы, состоящей из симптомов кататонической шизофрении, параноидной шизофрении, дезорганизованной шизофрении и резидуальной шизофрении.

В еще одном своем варианте указанное соединение вводят в количестве, превышающем 1 мг/день.

В еще одном своем варианте указанное соединение вводят в количестве, превышающем 5, 10 или 50 мг/день.

В еще одном своем варианте указанное количество соединения вводят один или несколько раз в день.

В еще одном своем варианте указанное соединение обладает быстрым началом действия.

В еще одном своем варианте настоящее изобретение относится к более быстрому ослаблению симптомов шизофрении, чем с применением известных соединений.

В еще одном своем варианте указанные симптомы шизофрении ослабляются через две недели, предпочтительно через одну неделю, еще более предпочтительно в течение одной недели, еще более предпочтительно через два дня, еще более предпочтительно в течение двух дней, а наиболее предпочтительно через один день.

В еще одном своем варианте настоящее изобретение относится к экстренной терапии.

В еще одном своем варианте настоящее изобретение относится к длительному лечению.

Настоящее изобретение относится к применению соединения для получения фармацевтической композиции для лечения или ослабления симптомов шизофрении, где указанное соединение выбрано из группы, состоящей из

этилового эфира N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты;

2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамида;

N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамида;

N-(4,6-диметил-2-морфолин-4-илпиримидин-5-ил)-2-(4-фторфенил)ацетамида;

(2,6-дифтор-4-морфолин-4-илфенил)амида гексановой кислоты;

2-циклопентил-N-(4,6-диметил-2-морфолин-4-илпиримидин-5-ил)ацетамида;

N-(2-бром-4-морфолин-4-ил-6-трифторметилфенил)пропионамида;

N-(2,4-диметил-6-морфолин-4-илпиридин-3-ил)-3,3-диметилбутирамида;

этилового эфира [2-амино-4-(2,4,6-триметилбензиламино)фенил]карбаминовой кислоты и

2-циклопентил-N-(2-метокси-6-метил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамида.

Термин "калиевый KCNQ-канал" означает одномерные или гетеромерные калиевые каналы, состоящие по меньшей мере из одной субъединицы одного из KCNQ-каналов, выбранных из группы, состоящей из KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4 и KCNQ5.

Термин "антипсихотическая активность", если он относится к соединению, означает, что данное соединение обладает действием, направленным на устранение или ослабление одного или нескольких симптомов психотического расстройства. Одним из таких психотических расстройств является шизофрения.

Термин "лечение", используемый в описании в связи с заболеванием или расстройствами, также включает, в зависимости от обстоятельств, предупреждение, подавление и ослабление симптомов.

Термин "экстренное лечение" означает введение или повторное введение соединения согласно изобретению для ослабления (или, по меньшей мере, частичного смягчения) обострения психоза.

Термин "длительное лечение" означает поддерживающую терапию или пожизненное лечение.

Термин "хозяин" означает любое животное. Хозяин, такой как человек, подвергаемый лечению соединением согласно изобретению, фактически, может принадлежать к любым группам людей, мужчин или женщин, которые могут быть подразделены на детей, взрослых или людей пожилого возраста. Варианты настоящего изобретения включают любую из этих групп пациентов.

Термин "эффективное количество" означает количество/дозу соединения или фармацевтической композиции, которое/которая является достаточным(ой) для продуцирования эффективного ответа (т.е. биологического или терапевтического ответа ткани, системы, организма животного или человека, обнаруживаемого исследователем, ветеринаром, практическим врачом или другим врачом-клиницистом) после его введения индивидууму.

"Эффективное количество" может варьироваться, *inter alia*, в зависимости от конкретного заболевания и его тяжести, а также от возраста, массы тела, физического состояния индивидуума и от его восприимчивости к данному лечению.

Потенциал соединений, используемых для лечения психотических расстройств, где одно из таких соединений обладает способностью подавлять ажитированное психотическое поведение, ослаблять приступы острого психоза, снижать интенсивность психотических симптомов и оказывать седативное действие, подтверждается поведенческими тестами *in vivo*, указывающими на антипсихотически подобное поведение, такое как способность к подавлению гиперактивности, индуцированной острой стимуляцией; ингибирование ответа с сенсibilизацией (гиперактивности) амфетамином и ингибирование реакции условно-рефлекторного избегания.

Потенциал соединения, используемого для устранения позитивных симптомов, где указанные позитивные симптомы определяются как группа симптомов шизофрении, включающая формирование бреда и галлюцинаций (висцеральных, зрительных, слуховых), подтверждается поведенческими тестами *in vivo*, указывающими на антипсихотически подобное поведение, такое как ингибирование гиперактивности, индуцированной стимулятором; ингибирование ответа с сенсibilизацией (гиперактивности) амфетамином и реакции условно-рефлекторного избегания.

Потенциал соединения, используемого для устранения негативных симптомов, где указанные негативные симптомы определяются как группа симптомов шизофрении, включающая эмоциональную дисгармонию и регрессивное поведение, подтверждается позитивными эффектами в тесте принудительного плавания, т.е. в поведенческом тесте *in vivo*, указывающем на активность данного соединения, подобную активности антидепрессантов.

Потенциал соединения, обладающего быстрым началом терапевтической эффективности, определяют как потенциал соединения, обладающего быстрым началом клинического терапевтического действия, т.е. более быстрым началом действия, чем действие известных клинически активных соединений, обычно используемых для данных показаний, и такой потенциал подтверждают *in vivo* в электрофизиологических тестах на скорость спонтанного возбуждения допаминовых клеток в области вентральной покрышки, показывая сильное ингибирующее действие соединения (в отличие от ингибирующего действия только после длительного непрерывного введения соединения).

Отсутствие побочных эффектов, ассоциированных с антагонизмом D2, определяют как устранение побочных эффектов, ассоциированных с действием рецептора D2, обусловленное отсутствием прямого участия рецепторов D2 в механизме действия вышеупомянутых соединений.

Потенциал, направленный против биполярного расстройства, определяют как эффективность лечения биполярного расстройства, тяжелого аффективного расстройства, которое характеризуется резкой сменой настроения (мании и/или депрессии) и тенденцией к чередованию ремиссий и рецидивов.

Антиманиакальный потенциал соединения определяют как потенциал этого соединения к подавлению маний, т.е. части спектра симптомов биполярного расстройства, которая подтверждается поведенческими тестами *in vivo*, указывающими на антиманиакальную активность данного соединения, такую как ингибирование гиперактивности, индуцированной стимуляцией, и ингибирование реакции сенсибилизированного (гиперактивности) ответа на амфетамин.

Потенциал, направленный на подавление биполярной депрессии, определяют как эффективность в лечении депрессии, являющейся частью спектра симптомов биполярного расстройства, и подтверждают позитивными эффектами в тесте принудительного плавания, т.е. в поведенческом тесте *in vivo*, указывающем на активность данного соединения, подобную активности антидепрессантов.

Антидепрессантный потенциал определяют как эффективность в лечении пациентов, страдающих тяжелой депрессией, и подтверждают позитивными эффектами в тесте принудительного плавания, т.е. в поведенческом тесте *in vivo*, указывающем на активность данного соединения, подобную активности антидепрессантов.

Тест на гиперактивность, индуцированную острой стимуляцией, представляет собой *in vivo* тест, проводимый на крысах, которым вводят *s.c.* инъекцию ударной дозы сульфата амфетамина, вызывающего локомоторную активность (поведение психотического типа), которая может подавляться соединением антипсихотического или антиманиакального действия.

Тест на гиперактивность, индуцированную сенсибилизацией амфетамином, представляет собой *in vivo* тест, проводимый на мышах, которых подвергают периодической обработке амфетамином, в результате чего эти мыши становятся восприимчивыми (у них наблюдается повышенная реакция типа локомоторной активности) к последующим субдозам сульфата амфетамина. Такая повышенная реакция может быть ингибирована соединениями антипсихотического или антиманиакального действия.

Тест на спонтанное возбуждение мезолимбических DA-клеток представляет собой *in vivo* тест, который проводят на анестезированных крысах и в котором оценивают скорость спонтанного возбуждения допаминовых нейронов в области вентральной покрышки.

Тест принудительного плавания представляет собой *in vivo* тест, проводимый на мышах, в котором оценивают время неподвижного состояния мыши после ее погружения в воду за короткий период проведения эксперимента (в течение нескольких минут). Соединения-антидепрессанты выводят мышь из этого состояния.

Соединения формулы 1 могут быть получены, как описано в WO 2004/058739. Соединения формулы 2 могут быть получены, как описано в WO 2004/082677. Соединения формулы 3 могут быть получены, как описано в WO 2004/080950. Соединения формулы 4 могут быть получены, как описано в WO 2004/096767. Соединения формулы 5 могут быть получены, как описано в WO 2005/087754. Соединения формулы 6 могут быть получены, как описано в WO 2006/029623. Соединения формулы 7 могут быть получены, как описано в WO 2006/092143. Соединения формулы 8 могут быть получены, как описано в PCT/DK06/050039. Соединение формулы 9 может быть получено, как описано в EP 554543.

В одно из аспектов изобретение относится к применению, где соединение представляет собой этиловый эфир N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом из аспектов изобретение относится к применению, где соединение представляет собой 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид или его фармацевтически приемлемую соль.

В еще одном из аспектов изобретение относится к применению, где соединение представляет собой N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамид или его фармацевтически приемлемую соль.

Также изобретение относится к применению, где соединение представляет собой N-(4,6-диметил-2-морфолин-4-илпиримидин-5-ил)-2-(4-фторфенил)ацетамид или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом из аспектов изобретение относится к применению, где соединение представляет собой N-(2,4-диметил-6-морфолин-4-илпиридин-3-ил)-3,3-диметилбутирамид или его фармацевтически прием-

лемую соль.

Солями согласно изобретению предпочтительно являются фармацевтически приемлемые соли. Такими солями являются фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли, фармацевтически приемлемые соли металлов, соли аммония и алкилированные соли аммония.

Фармацевтически приемлемыми солями согласно изобретению предпочтительно являются кислотно-аддитивные соли. Кислотно-аддитивными солями согласно изобретению предпочтительно являются фармацевтически приемлемые соли соединений согласно изобретению, образованные нетоксичными кислотами. Кислотно-аддитивными солями являются соли неорганических кислот, а также соли органических кислот. Репрезентативными примерами подходящих неорганических кислот являются хлористоводородная, бромистоводородная, йодистоводородная, серная, сульфамовая, фосфорная и азотная кислоты и т.п. Репрезентативными примерами подходящих органических кислот являются муравьиная, уксусная, трихлоруксусная, трифторуксусная, пропионовая, бензойная, коричная, лимонная, фумаровая, гликолевая, молочная, малеиновая, яблочная, малоновая, миндальная, щавелевая, пикриновая, пировиноградная, салициловая, янтарная, этансульфоновая, винная, аскорбиновая, памовая, глюконовая, цитраконовая, аспарагиновая, стеариновая, пальмитиновая, EDTA, гликолевая, парааминобензойная, глутаминовая, бис-метиленсалициловая, метансульфоновая, этандисульфоновая, итаконовая, бензолсульфоновая, паратолуолсульфоновая и теofilлинуксусная кислоты, а также 8-галогентеофиллины, например 8-бромтеофиллин и т.п. Другими примерами фармацевтически приемлемых солей присоединения неорганических или органических кислот являются фармацевтически приемлемые соли, перечисленные в статье J. Pharm. Sci. 1977, 66, 2, которая вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Примерами солей металлов являются соли лития, натрия, калия, магния и т.п.

Примерами солей аммония и алкилированных солей аммония являются соли аммония, метил-, диметил-, триметил-, этил-, гидроксиэтил-, диэтил-, н-бутил-, втор-бутил-, трет-бутил-, тетраметиламмония и т.п.

Следует также отметить, что в настоящем изобретении в понятие "фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли" входят гидраты, образуемые соединениями согласно изобретению.

Соединения согласно изобретению могут иметь один или несколько асимметрических центров, и при этом подразумевается, что в объем настоящего изобретения входят любые оптические изомеры этих соединений, такие как оптически разделенные, чистые или частично очищенные оптические изомеры или их рацемические смеси.

Кроме того, если в молекуле присутствует двойная связь, либо полностью или частично насыщенная циклическая система, то могут образовываться геометрические изомеры. При этом подразумевается, что в объем настоящего изобретения входят любые геометрические изомеры, такие как разделенные, чистые или частично очищенные геометрические изомеры или их смеси. Аналогичным образом, молекулы, имеющие связь со стерически ограниченным вращением, могут образовывать геометрические изомеры. Такие изомеры также входят в объем настоящего изобретения.

Кроме того, некоторые соединения согласно изобретению могут существовать в различных таутомерных формах, и при этом подразумевается, что любые таутомерные формы, образованные указанными соединениями, входят в объем настоящего изобретения.

Соединения согласно изобретению могут существовать в несольватированных формах, а также в виде сольватов с растворителями, такими как вода, этанол и т.п. В общих чертах, сольваты могут рассматриваться как эквиваленты несольватированных форм, в зависимости от целей изобретения. Рацемические формы могут быть разделены на оптические антиподы известными методами, например путем разделения их диастереомерных солей с использованием оптически активной кислоты, с последующим высвобождением оптически активного аминного соединения путем обработки основанием. Другой метод разделения рацематов на оптические антиподы основан на хроматографии, проводимой на оптически активной матрице. Рацемические соединения согласно изобретению могут быть также разделены на их оптические антиподы, например, путем фракционированной кристаллизации солей (D- или L-винной кислоты, миндальной кислоты или камформульфоновой кислоты). Соединения согласно изобретению могут быть также разделены посредством образования диастереомерных производных.

Могут быть применены и другие методы разделения оптических изомеров, известные специалистам. Такие методы обсуждаются в публикации J. Jaques, A. Collet and S. Wilen in "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley & Sons, New York (1981).

Оптически активные соединения могут быть также получены из оптически активных исходных веществ.

Соединения согласно изобретению или их соли могут быть введены отдельно или в комбинации с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями в виде разовой дозы или дробных доз. Фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть получены с использованием фармацевтически приемлемых носителей или разбавителей, а также любых других известных адъювантов и наполнителей в соответствии со стандартными методами, описанными в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19 Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995.

Фармацевтические композиции могут быть, в частности, приготовлены так, чтобы они были пригодными для их введения любым подходящим способом, таким как пероральное, ректальное, назальное, внутрилегочное, местное (включая буккальное и подъязычное), трансдермальное, интрацестернальное, внутрибрюшинное, вагинальное и парентеральное (включая подкожное, внутримышечное, интратекальное, внутривенное и чрескожное) введение, причем предпочтительным является пероральное введение. Следует отметить, что предпочтительный способ введения зависит от общего состояния здоровья и возраста индивидуума, подвергаемого лечению, от природы расстройства или заболевания, подвергаемого лечению, и от выбранного активного ингредиента.

Фармацевтические композиции, полученные путем объединения соединения согласно изобретению и фармацевтически приемлемых носителей, могут быть легко введены в виде различных лекарственных форм, подходящих для их применения в описанных способах введения. Указанные композиции могут быть соответствующим образом приготовлены в виде унифицированной лекарственной формы методами, известными специалистам-фармацевтам.

Соединения согласно изобретению обычно используют в виде свободного вещества или в виде его фармацевтически приемлемой соли. Одним из примеров может служить кислотно-аддитивная соль соединения, обладающая активностью свободного основания. Если соединение согласно изобретению содержит свободное основание, то такие соли получают стандартными методом путем обработки раствора или суспензии свободного основания согласно изобретению химическим эквивалентом фармацевтически приемлемой кислоты. Репрезентативные примеры приводятся выше.

Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть твердыми или жидкими. Твердыми лекарственными формами для перорального введения являются, например, капсулы, таблетки, драже, пилюли, пастилки, порошки, гранулы и таблетки, например, заключенные в жесткую желатиновую капсулу и приготовленные в порошкообразной или гранулированной форме, или, например, в форме пастилок или леденцов. Если это необходимо, то на фармацевтические композиции для перорального введения могут быть нанесены покрытия, например энтеросолюбильные покрытия, либо такие композиции могут быть приготовлены для регулируемого высвобождения активного ингредиента, например, длительного или пролонгированного высвобождения, в соответствии с методами, хорошо известными специалистам. Жидкими лекарственными формами для перорального введения являются, например, растворы, эмульсии, суспензии, сиропы и эликсиры.

Препараты согласно изобретению, подходящие для перорального введения, могут быть приготовлены в виде дискретных форм, таких как капсулы или таблетки, каждая из которых содержит предварительно определенное количество активного ингредиента и которые могут включать подходящий наполнитель. Кроме того, препараты для перорального введения могут быть приготовлены в виде порошка или гранул, в виде раствора или суспензии в водной или безводной жидкости либо в виде жидкой эмульсии типа "масло-в-воде" или "вода-в-масле".

Подходящими фармацевтическими носителями являются инертные твердые разбавители или наполнители, стерильный водный раствор и различные органические растворители. Примерами твердых носителей являются лактоза, высокосортный гипс, сахароза, циклодекстрин, тальк, желатин, агар, пектин, аравийская камедь, стеарат магния, стеариновая кислота, низшие алкиловые эфиры целлюлозы, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, камеди и т.п. Примерами жидких носителей являются сироп, арахисовое масло, оливковое масло, фосфолипиды, жирные кислоты, амины жирных кислот, полиоксипропилен и вода.

Носитель или наполнитель может включать любое известное вещество, обеспечивающее пролонгированное высвобождение, такое как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат, взятый отдельно или в смеси с воском.

В этих целях обычно используют любые адьюванты или добавки, такие как красители, ароматизаторы, консерванты и т.п., при условии, что они являются совместимыми с активными ингредиентами.

Количество твердого носителя может варьироваться, но обычно оно составляет от примерно 25 мг до примерно 1 г.

Если используется жидкий носитель, то такой препарат может быть приготовлен в виде сиропа, эмульсии, мягкой желатиновой капсулы или стерильной жидкости для инъекций, такой как водные или безводные жидкие суспензии или растворы.

Таблетки могут быть приготовлены путем смешивания активного ингредиента с обычными адьювантами или разбавителями с последующим прессованием смеси в стандартной таблетировочной машине.

Фармацевтическими композициями для парентерального введения являются стерильные водные и безводные растворы, дисперсии, суспензии или эмульсии для инъекций, а также стерильные порошки, которые перед их использованием могут быть разведены с получением стерильных растворов или дисперсий для инъекций. В объем настоящего изобретения также входят депо-препараты для инъекций.

Для парентерального введения могут быть использованы растворы соединения согласно изобретению в стерильном водном растворе, в водном пропиленгликоле, в водном растворе витамина Е или в кунжутном или арахисовом масле. Такие водные растворы, если это необходимо, должны быть соответ-

ствующим образом забуферены, а жидкий разбавитель должен быть сначала сделан изотоничным путем добавления достаточного количества физиологического раствора или глюкозы. Водные растворы, в частности, могут быть использованы для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутривнутрибрюшинного введения. Все стерильные водные среды могут быть легко приготовлены стандартными методами, известными специалистам.

Растворы для инъекций могут быть приготовлены путем растворения активного ингредиента и подходящих добавок в части растворителя для инъекций, предпочтительно в стерильной воде, доведения раствора до нужного объема, его стерилизации и заполнения этим раствором подходящих ампул или флаконов. При этом могут быть включены любые подходящие добавки, обычно используемые специалистами, такие как агенты для придания тоничности, консерванты, антиоксиданты и т.п.

Другими подходящими формами для введения являются суппозитории, спреи, мази, кремы, гели, аэрозоли, чрескожные пластыри, имплантаты и т.п.

Типичная оральная доза составляет от примерно 0,001 до примерно 100 мг/кг массы тела в день, а предпочтительно от примерно 0,01 до примерно 50 мг/кг массы тела в день, а более предпочтительно от примерно 0,05 до примерно 10 мг/кг массы тела в день, и эта доза может быть введена в виде разовой дозы или в виде дробных доз, например 1-3 доз. Точная доза зависит от частоты и способа введения, от пола, возраста, массы тела и общего состояния здоровья индивидуума, подвергаемого лечению, а также от природы и тяжести расстройства или заболевания, подвергаемого лечению, от наличия любых сопутствующих заболеваний, подвергаемых лечению, и от других факторов, известных специалистам.

Такие препараты обычно приготавливают в виде унифицированной лекарственной формы методами, известными специалистам. Типичная унифицированная лекарственная форма для перорального введения, вводимая один или несколько раз в день, например 1-3 раза в день, может содержать от 0,01 до примерно 1000 мг, например от примерно 0,01 до 100 мг, предпочтительно от примерно 0,05 до примерно 500 мг, а более предпочтительно от примерно 0,5 до примерно 200 мг.

Для парентерального введения, такого как внутривенное, интратекальное, внутримышечное введение и т.п., типичная доза составляет примерно половину дозы, обычно используемой для перорального введения.

Ниже приводятся типичные примеры рецептов приготовления препаратов согласно изобретению.

1) Таблетки, содержащие 5,0 мг соединения согласно изобретению, в расчете на свободное основание, мг:

соединение согласно изобретению	5,0
лактоза	60
кукурузный крахмал	30
гидроксипропилцеллюлоза	2,4
микрористаллическая целлюлоза	19,2
натрийсодержащая кроскармелоза типа А	2,4
стеарат магния	0,84

2) Таблетки, содержащие 0,5 мг соединения согласно изобретению, в расчете на свободное основание, мг:

соединение согласно изобретению	0,5
лактоза	46,9
кукурузный крахмал	23,5
повидон	1,8
микрористаллическая целлюлоза	14,4
натрийсодержащая кроскармелоза типа А	1,8
стеарат магния	0,63

3) Сироп, содержащий (на 1 мл), мг:

соединение согласно изобретению	25
сорбит	500
гидроксипропилцеллюлоза	15
глицерин	50
метилпарабен	1
пропилпарабен	0,1
этанол	0,005
отдушка	0,05
натрийсодержащий сахарин	0,5
вода	до 1 мл

4) Раствор для инъекций, содержащий (на 1 мл), мг:	
соединение согласно изобретению	0,5
сорбит	5,1
уксусная кислота	0,05
натрийсодержащий сахарин	0,5
вода	до 1 мл

Экспериментальная часть

Ниже приводятся семь примеров, в которых представлено научное обоснование изобретения, описанного в настоящем изобретении. Все полученные здесь результаты являются беспрецедентными, т.е. ни в одном из письменных материалов не было обнаружено каких-либо описаний, указывающих на аналогичные результаты.

Пример 1. Электрофизиология, крысы.

Имеющиеся данные дают основание предположить, что ингибирование ряда спонтанно активных допаминергических нейронов в области вентральной покрышки (VTA), т.е. в мезолимбической системе крыс, может быть обусловлено антипсихотическим действием соединения (Chiodo & Bunney 1983, *J. Neurosci.*, 5, 2539-2544). В мезолимбической системе все клинически эффективные нейролептики сначала увеличивают скорость возбуждения допаминергических нейронов (Tung et al., 1991, *J. Neural Transm. Gen Sect.*, 84(1-2), 53-64). Но, в конечном счете, такие нейролептики после их длительного введения (после 3-4-недельного введения) снижают скорость возбуждения до уровней ниже уровней, наблюдаемых до их введения (Skarsfeldt, 1992, *Synapse*, 10, 25-33; White и Wang 1983, *Science*, 221, 1054-1057). Такое ингибирующее действие нейролептиков на допаминергические нейроны, которое, по всей вероятности, опосредуется блокадой деполяризации, является, как очевидно, терапевтически значимым и играет важную роль в антипсихотическом действии нейролептиков (Grace и Bunney, 1986, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238, 1092-1100). Следовательно, можно сделать вывод, что соединение, вызывающее резкое снижение скорости спонтанного разряда импульсов мезолимбических допаминергических нейронов, вероятно, обладает быстрым началом антипсихотического потенциала. Присутствие субъединиц KCNQ на DA-нейронах в VTA у грызунов было полностью подтверждено исследованиями, но их функции пока еще не выявлены (Saganich et al. 2001, *J. Neurosci.* 21(13), 4609-4624; Cooper et al. 2001, *J. Neurosci.*, 21(24), 9529-9540). Затем были проведены исследования *in vivo* для того, чтобы определить, способны ли открыватели KCNQ-каналов к резкому подавлению спонтанной активности DA-нейронов в VTA.

Животные.

Были использованы самцы крыс Wistar (Harlan, The Netherlands) весом 270-340 г. Этих животных помещали в клетки с продолжительностью дня/ночи 12 ч в регулируемых условиях с постоянной комнатной температурой ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) и влажностью ($55 \pm 5\%$), а также со свободным доступом (*ad libitum*) к корму и к водопроводной воде.

Экспериментальная процедура.

Крыс анестезировали путем внутривенной инъекции хлоралгидрата (400 мг/кг). Затем в бедренную вену вставляли катетер для дополнительных инъекций анестетика (100 мг/кг) и введения лекарственного средства. После этого животных фиксировали на стереотаксическом аппарате, череп обнажали, и в черепе над областью вентральной покрышки просверливали отверстие ($0,5 \times 0,5$ см). Внеклеточную регистрацию потенциала действия одной клетки осуществляли с использованием электродов, изготовленных из стеклянных капилляров и наполненных 2% пентаминовым небесно-голубым в 2 М NaCl. Кончик электрода вводили в микроскоп для калибровки сигнала с получением сопротивления 2,0-8,0 МΩ при 135 Гц. Затем этот электрод вживляли в головной мозг с использованием гидравлического микропривода в следующих координатах: 5,5-5,0 мм сзади от точки брегмы; 0,5-0,9 мм сбоку от срединной линии. Внеклеточный потенциал действия усиливали, подвергали селекции и наблюдали на осциллографе и на аудиомониторе. Отобранные спайки объединяли и анализировали с помощью компьютерной программы Spike 2 (Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, UK) на PC-системе, подсоединенной к интерфейсу CED 1401 (Cambridge Electronic Design Ltd.). Предполагаемые допаминергические нейроны обычно присутствуют на 7,0-8,5 мм ниже поверхности головного мозга и характеризуются (1) медленным и нерегулярным характером разряда импульсов (0,5-10 Гц) и (2) трехфазными потенциалами действия с преобладанием позитивного компонента, негативного компонента, а за ним минорного позитивного компонента, с общей продолжительностью $> 2,5$ мс (Bunney et al. 1973, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 185, 560-571).

Введение соединений.

После получения стабильного фонового уровня возбуждения суммарные дозы этилового эфира N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты (дозы 0,3-6,0 мг/кг; объем 0,15-1,0 мл/кг); 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамида (дозы 0,03-0,3 мг/кг; объем 0,1-1,0 мл/кг) или N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамида (дозы 0,03-0,5 мг/кг; объем 0,12-1,0 мл/кг) вводили *i.v.*, причем каждую инъекцию вводили через интервал времени по меньшей мере 3 мин. Эти внутривенные (*i.v.*) дозы соответствовали подкожным (*s.c.*) дозам

0-10 мг/кг.

Статистический анализ.

Эффекты лекарственных средств оценивали путем статистического сравнения средней скорости разряда импульсов, вычисленной за 2-3 мин непосредственно до введения первого лекарственного средства (базовая линия), со средней скоростью разряда, вычисленной по меньшей мере за 60 с при максимальном эффекте лекарственного средства. Полученные данные анализировали с помощью статистического одностороннего ANOVA с последующей оценкой с помощью *posthoc* критерия Стьюдента-Ньюмана-Кейлса. Величина *p*, составляющая менее чем 0,05, рассматривалась как статистически значимая.

Результаты.

Как видно из табл. 1, этиловый эфир N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты, 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид и N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамид оказывали значимое и дозозависимое ингибирующее действие на спонтанное возбуждение DA-клеток в VTA у анестезированных крыс после введения им ударной дозы соединения. Эти данные подтвердили, что указанные соединения обладают быстрым антипсихотическим действием.

Таблица 1
Влияние соединений на спонтанный разряд импульсов DA-клеток в VTA анестезированных крыс

Суммарная доза (мг/кг)	Этиловый эфир N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты	2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид	N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамид
0 (носитель)	97,5±1,2(6)	97,8±0,7(8)	97,5±0,8(10)
0,03	-	95,1±1,9(4)	89,8±4,5(5)
0,1	-	88,2±2,8(5)*	81,0±4,0(5)**
0,25	-	-	74,1± 6,3(4) ***
0,3	95,4±5,0(4)	74,6±3,6 (4)***	-
0,5	-	-	68,1±6,0(4) ***
0,6	-	64,1±7,1(2)***	-
0,9	-	55,8±6,5(2)***	-
1,0	90,5±4,6(5)	-	57,1±7,9(3)***
2,0	81,1±5,1(5)*	-	-
4,0	67,1±3,7(4)***	-	-
6,0	60,6±0,7(2) ***	-	-

Среднее±стандартное отклонение среднего.

Скорости спонтанного возбуждения DA-клеток выражены в процентах от фоновой скорости возбуждения.

n указано в скобках.

p*<0,05, *p*<0,01, ****p*<0,001 по сравнению с фоновым уровнем (активности перед введением лекарственного средства).

Пример 2. Стимуляция крыс амфетамином.

Введение D-амфетамина грызунам стимулирует повышение локомоторной активности, опосредуемой мезолимбическими допаминовыми рецепторами в подлежащем ядре. Хотя психогенный психоз не может служить моделью всех форм шизофрении, однако он может иллюстрировать параноидную шизофрению и нешизофренические психотические расстройства (Krystal et al. p. 214-224 in *Neurobiology of Mental Illness* ISBN 0-19-511265-2). Очевидно, что ингибирование повышения индуцированной амфетамином локомоторной активности является надежным методом оценки антипсихотического потенциала соединений (Ögren et al., *European J. Pharmacol.* 1984, 102, 459-464). В нижеследующем эксперименте было проведено исследование для того, чтобы определить, можно ли использовать ингибирование спонтанных DA-нейронов в мезолимбической системе, которое было проанализировано, как описано выше, для оценки результатов поведенческого теста на антипсихотическое действие соединений.

Животные.

Были использованы самцы крыс Wistar (Taconic, Denmark) весом 170-240 г. Этих животных помещали в клетки с продолжительностью дня/ночи 12 ч в регулируемых условиях с постоянной комнатной температурой (21±2°C) и влажностью (55±5%), а также со свободным доступом (*ad libitum*) к корму и к водопроводной воде. Для оценки каждой дозы использовали восемь крыс, а также использовали параллельную контрольную группу животных, которым, помимо тест-соединения+d-амфетамина вводили носитель, и группу животных, которым вводили только носитель.

Экспериментальная процедура.

Этот эксперимент проводили в условиях нормального освещения и в спокойном помещении. Тестируемое вещество инъецировали *s.c.* за 30 мин до инъекции сульфата d-амфетамина (0,5 мг/кг). Сразу после инъекции d-амфетамина крыс помещали в индивидуальные тест-клетки, которые находились на U-образной опоре, снабженной 4 источниками инфракрасного излучения и фотоэлементами. Пучки света

пересекали клетку на высоте 4 см от дна клетки. Для регистрации числа перемещений требуется прерывание пучков падающего света, что позволяет исключить число перемещений, индуцированных в стационарном состоянии крысы. Подвижность (число перемещений) регистрировали в течение 2 ч. Среднюю подвижность, индуцированную введением носителя (физиологического раствора) в отсутствие d-амфетамина, принимали за фоновое значение. 100%-ный эффект d-амфетамина соответственно вычисляли по формуле: суммарная подвижность минус фоновое значение. Ответ у групп, которым вводили тестируемое соединение, определяли по формуле: суммарная подвижность минус фоновое значение и выражали в процентах от аналогичного результата, полученного для параллельной контрольной группы, которой вводили амфетамин. Процент ответов преобразовывали в процент ингибирования и из этой величины вычисляли величины ED₅₀ с помощью log-пробит-анализов. В параллельной серии данных потенциальные седативные свойства (ингибирование подвижности) тестируемых соединений оценивали путем проведения, по существу, такой же процедуры, за исключением того, что в этом анализе не вводили сульфата d-амфетамина для оценки инициации локомоторной активности.

Результаты.

Как видно из табл. 2, этиловый эфир N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты, N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамид и 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид ингибировали индуцированную d-амфетином гиперактивность у крыс. Эффективность, с которой действуют эти соединения, была выше, чем их эффективность в ингибировании локомоторной активности, т.е. ингибирование индуцированной амфетином гиперактивности не может объясняться седативными свойствами указанных соединений. А если точно сказать, такая эффективность должна свидетельствовать об антипсихотическом потенциале этилового эфира N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты, N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамида и 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамида. Поскольку литий широко используется как эффективное средство для лечения острых маниакальных состояний и для профилактики биполярных расстройств (Goldberg 2000, J. Clin. Psychiatry, 61 (Suppl. 13), 12-18), а оланзапин считается эффективным средством для лечения шизофрении, и оба они являются эффективными в этой модели, то данные, полученные с использованием указанных средств, подтвердили эффективность этилового эфира N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты, N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамида и 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамида для лечения маниакального состояния и биполярного расстройства, а также шизофрении.

Таблица 2

Влияние соединений на индуцированную амфетином гиперактивность у крыс		
Соединение	Действие, ингибирующее действие амфетамина ED ₅₀ (мг/кг)±ср. кв. от.	Ингибирование подвижности ED ₅₀ (мг/кг)±ср. кв. от.
Этиловый эфир N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)-карбаминовой кислоты	2,3(1,2)	>8,1
N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамид	2,1(1,5)	7,6(4,8)
2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид	2,6(2,3)	5,3(2,6)
Хлорид лития	12(1,7)	>40
Оланзапин	0,21(1,7)	0,72(2,4)

Пример 3. Микродиализ крыс.

Хорошо известно, что психостимуляторы повышают локомоторную активность посредством увеличения внеклеточных уровней DA в подлежащем ядре, которое представляет собой терминальную область мезолимбических проводящих нервных DA-путей (Guix et al., 1992, Neurosci. Lett., 138(1), 137-140; Moghaddam et al., 1989, Synapse, 4(2), 156-161). Также известно, что антагонистическое действие антипсихотических средств на индуцированную стимуляторами гиперактивность ассоциируется с действием антипсихотических средств, направленных на ингибирование уровней стимулированных DA в подлежащем ядре (Broderick et al., 2004, Prog. Neuropsychopharmacology and Biol. Psych., 28, 157-171). Таким образом, подлежащее ядро представляет собой подходящий нейронатомический участок для анализа на рецидивы позитивных симптомов психоза. Поэтому для оценки действия этилового эфира N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты, 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамида, N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамида на базовые и индуцированные амфетином уровни DA в подлежащем ядре свободно перемещающихся крыс проводили нижеследующие эксперименты. Эти эксперименты проводили так, чтобы эти данные можно было сравнить с данными, полученными в поведенческом тесте, описанном выше.

Животные.

Были использованы самцы крыс Sprague-Dawley (Charles River) с начальным весом 275-300 г. Этих животных помещали в клетки с продолжительностью дня/ночи 12 ч в регулируемых условиях с постоянной комнатной температурой ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) и влажностью ($55 \pm 5\%$), а также со свободным доступом (*ad libitum*) к корму и к водопроводной воде.

Хирургическая операция.

Животных анестезировали седативным средством/снотворным (2 мл/кг, *s.c.*) и стереотаксически имплантировали внутричерепную направляющую канюлю (СМА/12), помещая кончик диализного зонда в подлежащее ядро (координаты: на 1,7 мм перед брегмой, на -1,2 мм сбоку от брегмы, на расстоянии 8,0 мм от твердой мозговой оболочки). Для фиксации направляющей канюли использовали закрепляющие винты и акриловый цемент. Температуру тела поддерживали при 37°C с использованием ректального зонда и нагревательной пластины. Затем крыс помещали в отдельные клетки и оставляли на 2 дня для восстановления после хирургической операции.

Экспериментальная процедура.

В день эксперимента неанестезированным животным через направляющую канюлю вводили микродиализные зонды (СМА/12, диаметром 0,5 мм, длиной 2 мм). Эти зонды подсоединяли к микроинжекторному насосу посредством двухканального шарнирного устройства, которое позволяет животным двигаться без ограничений. Перфузию микродиализного зонда отфильтрованным раствором Рингера (145 мм NaCl , 3 мм KCl , 1 мм MgCl_2 , $1,2 \text{ мм CaCl}_2$) проводили в течение всего эксперимента с постоянной скоростью потока 1 мкл/мин. После стабилизации в течение 180 мин начинали эксперимент. Диализаты собирали через каждые 20 мин. После проведения экспериментов крыс умерщвляли путем декапитации, после чего брали головной мозг, замораживали и делали срезы для подтверждения правильного расположения зонда.

Введение соединений.

2-Циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид (5 мг/кг), N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамид (5 мг/кг), ретигабин (8,1 мг/кг) или носитель (10% 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрин, изотонический, pH 5-7) вводили подкожно в объеме 2,5 мл/кг. Через 30 мин после первого введения соединения вводили сульфат dex-амфетамина (0,5 мг/кг *s.c.*).

Анализ диализата.

Концентрацию допамина (DA) в диализатах оценивали с помощью ВЭЖХ с электрохимической детекцией. Компоненты диализата разделяли с помощью обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (ODS 150×3 мм, 3 мкм). Подвижная фаза состояла из 90 мм NaH_2PO_4 , 50 мм цитрата натрия, 367 мг/л натрийсодержащей 1-октансульфоновой кислоты, 50 мкМ EDTA и 8% ацетонитрила (pH 4,0) при скорости потока 0,5 мл/мин. Электрохимическую детекцию DA осуществляли с помощью кулонометрического детектора, при напряжении: $E_1 = -75 \text{ мВ}$ и $E_2 = 300 \text{ мВ}$ (предохранительная ячейка 350 мВ) (Coullocherm II, ESA). Уровни диализатов DA в трех диализных образцах, взятых до введения соединений, усредняли и использовали как показатели фоновых уровней DA (100%).

Статистический анализ.

Уровни диализатов DA в трех диализных образцах, взятых до введения соединений, усредняли и использовали как показатели фоновых уровней DA (100%). Данные оценивали с использованием дисперсионных анализов для повторных измерений, а затем с использованием по *post-hoc* критерия (критерия Тьюки), если это необходимо. Величина $*p < 0,05$ рассматривалась как статистически значимая.

Результаты.

Как видно из табл. 3, этиловый эфир N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты ($p < 0,001$), 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид ($p < 0,05$) и N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамид ($p = 0,002$) значительно замедляли индуцированное амфетамином увеличение уровней DA в подлежащем ядре свободно передвигающихся крыс. При этом ни 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид, ни N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамид, ни ретигабин не оказывали значительного влияния на базальные уровни внеклеточного DA в этой области (данные не приводятся). Полученные данные дают основание предположить, что антагонистическое действие этилового эфира N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты, 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамида и N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамида, направленное на индуцированную амфетамином активность у крыс, наблюдаемую выше, т.е. антипсихотическую активность, действительно ассоциируется с подавлением индуцированных уровней DA в подлежащем ядре, что еще больше усиливает антипсихотическое действие этих соединений. Обнаружение того факта, что влиянию подвергались лишь индуцированные уровни DA, но не базальные уровни DA, дает основание предположить, что риск развития ангедонии, т.е. признака, который хоть и временно, но часто наблюдается при введении клинически эффективных антипсихотических средств, в данном случае, очень невелик.

Таблица 3

Влияние соединений на индуцированное амфетамином увеличение уровней DA в подлежащем ядре свободно двигающихся крыс

Время (мин)	Амфетамин+носитель, % от фонового уровня	Амфетамин+2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид (5 мг/кг), % от фонового уровня	Амфетамин+N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамид (5 мг/кг), % от фонового уровня	Амфетамин+этиловый эфир N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты (8,1 мг/кг), % от фонового уровня
-40	91±6	95±6	108±5	105±3
-20	96±5	106±5	100±3	99±6
0	112±7	99±4	91±4	96±6
20	168±19	125±9	112±12	160±11
40	338±27	264±39	227±46	241±33
60	375±46	265±17*	262±53*	221±26*
80	319±59	231±22	195±38*	217±14*
100	232±48	167±25	172±24	173±9
120	162±37	109±11	166±32	139±9
140	129±27	93±15	129±35	120±9

Показаны нормализованные уровни DA в подлежащем ядре свободно двигающихся крыс.

* $p < 0,05$ по сравнению с группой, которой одновременно вводили амфетамин-носитель.

Пример 4. Сенсibilизация амфетамином, мыши.

Клинические данные указывают на то, что у пациентов с шизофренией и с биполярным расстройством, которым не вводили амфетамин, наблюдался усиленный ответ на введение первой дозы амфетамина, что может свидетельствовать о допаминергической сенсibilизации этих пациентов (Strakowski et al. 1996, *Biol. Psychiatry*, 40, 872-880, Lieberman et al. 1987, *Psychopharmacology*, 91, 415-433, Strakowski et al., 2001, *CNS Drugs*, 15, 701-708). Этот феномен моделировали у грызунов путем повторного периодического введения амфетамина, приводящего к прогрессирующему усилению поведенческого ответа на стимуляцию амфетамином, т.е. феномена, известного как поведенческая сенсibilизация (Robinson and Berridge, *Brain Research Rev.* 1993, 18(3): 247-91). Очевидно, что в такой поведенческой сенсibilизации участвует мезолимбический допаминовый путь, который представляет собой главную рефлекторную дугу (Robinson and Becker, *Brain Research*, 1986, 396(2): 157-98). Ингибирование поведенческой реакции в ответ на введение ударной дозы амфетамина у сенсibilизированных животных может служить в качестве модели для оценки антипсихотического или антимианиакального действия соединений.

Животные.

Были использованы самцы мышей NMRI (Charles River) весом приблизительно 35 г. Этих животных помещали в клетки с продолжительностью дня/ночи 12 ч в регулируемых условиях с постоянной комнатной температурой ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) и влажностью ($55 \pm 5\%$), а также со свободным доступом (*ad libitum*) к корму и к водопроводной воде. Каждая экспериментальная группа содержала 12 мышей.

Экспериментальная процедура.

Всем мышам ежедневно в течение пяти дней вводили сульфат d-амфетамина (2,5 мг/кг, s.c.) или физиологический раствор (10 мл/кг). В течение 17 дней между последним днем предварительной обработки и днем проведения теста животных содержали в клетках их постоянного обитания со стандартным уходом, как описано выше. Этот эксперимент проводили в условиях нормального освещения и в спокойном помещении. Мышам вводили тестируемое вещество или носитель, после чего их помещали в отдельные тест-клетки на 30 мин. Затем мышам вводили сульфат d-амфетамина (1,25 мг/кг, s.c.) или физиологический раствор (5 мл/кг), после чего их снова помещали в тест-клетки, а затем начинали обработку данных. Для мониторинга локомоторной активности источники инфракрасного излучения 5×8 и фотоэлементы устанавливали на расстоянии 4 см друг от друга. Световые лучи пересекали клетку на 1,8 см выше дна клетки. Для регистрации числа движений требуется прерывание пучков падающего света, что позволяет исключить число движений, индуцированных в стационарном состоянии мыши.

Введение соединений.

Мышам, предварительно обработанным амфетамином и носителем, подкожно (s.c.) вводили этиловый эфир N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты (0-10 мг/кг), 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид (0-5 мг/кг) или N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамид (0-5 мг/кг) или носитель (10% 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрин, изотоничный, pH 5-7, 5 мл/кг) за 30 мин до обработки данных.

Анализы данных.

Все величины, полученные для каждой группы животных в 30-минутном тесте, усредняли и использовали для оценки лекарственных средств, а именно усредненную оценку подвижности, индуцированной амфетамином у животных, предварительно обработанных амфетамином, использовали как величину сенсibilизированного ответа. Среднюю величину подвижности, индуцированную носителем, у животных, предварительно обработанных носителем, использовали как величину фоновой подвижности. Эту фоновую величину вычитали из величины сенсibilизированного амфетамином ответа и принимали за 100%, т.е. как сенсibilизированный ответ. Это вычисление повторяли для каждой группы, которой вводили конкретную дозу, и величину, полученную для каждой такой группы, выражали как отношение к 100% величине. То есть ответ у сенсibilизированных амфетамином групп, которым вводили тестируемое соединение, определяли как сенсibilизированный ответ минус фоновая подвижность и выражали в процентах от аналогичного результата, полученного для группы животных, сенсibilизированных амфетамином. Процент ответов преобразовывали в процент ингибирования и подвергали log-пробит-анализу, в результате чего получали ED₅₀ для ингибирования сенсibilизированного ответа. Аналогичным образом, ED₅₀ для ингибирования фоновой подвижности вычисляли как величину реактивной подвижности у животных, предварительно обработанных носителем, сенсibilизированных и обработанных носителем, и обработанных лекарственным средством, по отношению к фоновой подвижности. Затем вычисляли терапевтический индекс путем деления первого ED₅₀ на второй.

Результаты.

Как видно из табл. 4, все соединения, а именно этиловый эфир N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты, N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамид и 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид, а также соединение лития с антимианкальным действием и антипсихотический оланзапин, все, ингибировали гиперактивность, индуцированную амфетамином у сенсibilизированных мышей. Эффективность, с которой действуют эти соединения, была выше, чем эффективность, с которой эти соединения ингибируют фоновую подвижность. Таким образом, эти соединения обладают успокаивающим действием, т.е. антипсихотическим/антимианкальным действием, независимым от их седативного действия (т.е. терапевтический индекс >1). Такое разделение функций характерно для нейролептиков (Kapur and Mamo, 2003, Biol. Psych. 27(7), 1081-1090), что подтверждает антипсихотический/антимианкальный потенциал этилового эфира N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты, N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамида, 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамида.

Таблица 4

Влияние соединений на поведенческую реакцию в ответ на введение амфетамина у сенсibilизированных мышей

Соединение	Ингибирование ответа у мышей, сенсibilизированных амфетамином, ED ₅₀ (±ср. кв. от.)(мг/кг)	Ингибирование фоновой подвижности, ED ₅₀ (±ср. кв. от.)(мг/кг)	Терапевтический индекс
Этиловый эфир N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)-карбаминовой кислоты,	4,4(1,4)	7,6(1,3)	2
N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамид	1,6(1,2)	>2,5	>1
2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид	1,2(1,3)	2,2(1,3)	2
N-(4,6-диметил-2-морфолин-4-илпиримидин-5-ил)-2-(4-фторфенил)ацетамид	0,4	2,2	5
(2,6-дифтор-4-морфолин-4-илфенил)амид гексановой кислоты	2,4	>5	>2

2-циклопентил-N-(4,6-диметил-2-морфолин-4-илпиримидин-5-ил)ацетамид	0,9	2,5	3
N-(2-бром-4-морфолин-4-ил-6-трифторметилфенил)-пропионамид	3,1	6,0	2
N-(2,4-диметил-6-морфолин-4-илпиридин-3-ил)-3,3-диметилбутирамид	1,4	3,1	2
Этиловый эфир [2-амино-4-(2,4,6-триметилбензиламино)-фенил]карбаминовой кислоты;	1,7	4,3	3
2-циклопентил-N-(2-метокси-6-метил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид	1,7	3,0	2
Хлорид лития	34(7,2)	>>40	>>1
Оланзапин	0,11(1,4)	>0,31	>3

Пример 5. Условно-рефлекторное избегание у крыс.

В тесте с применением модели реакции условно-рефлекторного избегания (CAR) крыс обучали поведению в ответ на действие раздражителя в течение определенного периода времени, т.е. крыса могла избежать электрического удара, подаваемого на лапы, путем перемещения из одного места в другое. Антипсихотические средства в пределах определенного диапазона доз селективно подавляют реакцию избегания, но при этом они не подавляют поведенческой реакции, выражающейся стремлением животного уйти от опасности воздействия электрошока. Модель CAR рассматривалась как прогностическая и надежная модель животного, восприимчивого к соединениям, обладающим антипсихотическим действием. Таким образом, было показано, что все клинически эффективные антипсихотические средства ингибируют CAR (Wadenberg and Hicks, *Neuroscience and Biobehav. Rev.* 23, 851-862, 1999).

Животные.

Были использованы самцы крыс Wistar (Taconic, Denmark), вес которых в начале исследования составлял 150 г. Крыс помещали в клетки по две крысы в каждую клетку и содержали с продолжительности дня/ночи 12 ч (свет включали в 6:00). Животных кормили один раз в день (приблизительно 6 гранул корма на крысу) для поддержания у них 80% веса, который они имели при свободном доступе к корму. Воду давали *ad libitum*. Температура ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) и относительная влажность ($55 \pm 5\%$) регулировались автоматически.

Экспериментальная процедура.

Тест на условно-рефлекторное избегание проводили с использованием автоматических челночных камер (ENV-010M, MED-Associates), каждую из которых помещали в комнату с высоким уровнем звукоизоляции. Каждая камера была разделена на два отделения перегородкой с отверстием. Положение животного и его переход из одного отделения в другое детектировали с помощью двух фотоэлементов, находящихся на каждой стороне разделяющей стенки. После воздействия условным раздражителем (CS), звуком и светом животным предоставляли 10 с, за которые они могли переходить в другое отделение челночной камеры для прекращения действия CS (испытание заканчивалось) и избегания появления безусловного раздражителя (UCS). Если крыса оставалась в том же самом отделении в течение более чем 10 с, то на лапы подавали UCS в виде скремблированного электрошока в 0,5 мА до тех пор, пока животное не убежит, или продолжительностью максимум 10 с. При этом оценивали следующие поведенческие факторы: условно-рефлекторное избегание (ответная реакция на CS в течение 10 с); уход от опасности (ответная реакция на CS+UCS); бездействие животного (отсутствие ответной реакции); переход в другое отделение во время перерыва между испытаниями и локомоторную активность. Крыс приучали к челночной камере за 3 мин до начала каждого раунда испытаний. Во время обучения каждый раунд испытания состоял из 30 испытаний с интервалами между раундами, произвольно варьирующимися от 20 до 30 с. Обучение проводили до тех пор, пока реакция избегания не наблюдалась у 80% крыс непрерывно в течение 3 дней. За один день до проведения этого теста проводили предварительный тест для получения фонового значения для каждого животного, т.е. эти животные сами служили в качестве контроля. Для тестирования каждой дозы соединения использовали 7-8 крыс. Также была включена параллельная контрольная группа, которой вводили носитель.

Введение соединений.

Этиловый эфир N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты (5 и 10 мг/кг), N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамид (2,5 и 5 мг/кг) и 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамида (2,5 и 5 мг/кг) вводили s.c. за 30 мин до начала проведения теста, в объеме 5 мл/кг. Все соединения растворяли в носителе, 10% 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрине (изотоничном с глюкозой, pH 5-7).

Статистические анализы.

Влияние соединений на поведенческие реакции избегания и отсутствие таких реакций статистически оценивали посредством одностороннего ANOVA-анализа для повторных измерений и последующего проведения post-hoc сравнений (методом Стьюдента-Ньюмана-Кейлса), если это было необходимо; p-уровни <0,05 рассматривались как статистически значимые.

Результаты.

Как видно из табл. 5, этиловый эфир N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты, 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид и N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамид значительно подавляли реакцию избегания, что указывало на антипсихотически подобную активность 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамида и N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамида (5 мг/кг) и этилового эфира N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты (10 мг/кг). Ни одна из тестируемых доз не вызывала каких-либо нарушений реакции избегания, соответствующих отсутствию влияния на двигательную активность (данные не приводятся). В заключение можно сделать вывод, что полученные данные подтвердили антипсихотический потенциал этилового эфира N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты, N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамида и 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамида.

Таблица 5

Влияние соединений на реакцию условно-рефлекторного избегания у крыс

Обработка	Процент ингибирования реакции избегания (ср. кв. от.) по отношению к фоновому уровню
Носитель (10% 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрин)	-2(4,2)
Этиловый эфир N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты, 5 мг/кг	1(6,7)
Этиловый эфир N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты, 10 мг/кг	59(37)***P<0,001
2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид, 2,5 мг/кг	5(3,5)
2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид, 5 мг/кг	65(36)***P<0,001
N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамид, 2,5 мг/кг	1(14)
N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамид, 5 мг/кг	71(26)***P<0,001

Пример 6. Тест принудительного плавания мыши.

Спектр шизофренических симптомов охватывает комплекс негативных симптомов, включая ангедонию, нарушение социальной адаптации и эмоциональное уплощение. Эти симптомы не поддаются эффективному лечению современными антипсихотическими средствами (Duncan et al. 2004, Schizophr. Res., 71(2-3), 239-248; Meltzer et al. 1986, J. Clin. Psychopharmacol., 6(6), 329-338).

Принудительное плавание представляет собой широко и часто применяемый тест, в котором используется модель для преclinical оценки на антидепрессантную активность соединения (Porsolt et al. 1977, Arch. Int. Pharmacodyn. 229, 327-336). Для оценки способности этилового эфира N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты, 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамида или N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамида к антидепрессантному действию или к действию, направленному на улучшение настроения, эти соединения испытывали на мышцах в тесте принудительного плавания.

Животные.

Были использованы самцы мышей NMRI (Charles River) весом 23-25 г. Этих мышей помещали в клетки по 8 животных на каждую клетку с продолжительностью дня/ночи 12 ч в регулируемых условиях с постоянной комнатной температурой (21±2°C) и влажностью (55±5%), а также со свободным доступом (ad libitum) к корму и к водопроводной воде. Каждая экспериментальная группа содержала 8 мышей.

Экспериментальная процедура.

Мышей помещали в 2000-миллилитровые лабораторные сосуды, содержащие 1200 мл подогретой воды (25°C) и оставляли на 6 мин для плавания. Активность мышей записывали на видеокамеру и полу-

ченные изображения оцифровывали и анализировали с помощью цифровой аналитической системы (Bioobserve). В последние 3 мин проведения теста для каждой мыши определяли количество времени, в течение которого животное оставалось неподвижным.

Обработка.

За 30 мин до начала теста мышам подкожно вводили N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамид, 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид или носитель (10% 2-ОН-пропилциклодекстрин, 10 мл/кг). Кроме того, в качестве позитивного контроля использовали имипрамин-НСI (40 мг/кг), а также включали контроль с использованием физиологического раствора (10 мл/кг).

Анализы.

Время неподвижности животных всех экспериментальных групп статистически оценивали по сравнению с релевантной контрольной группой с помощью одностороннего дисперсионного анализа. При необходимости может быть проведен post-hoc тест (методом Стьюдента-Ньюмана-Кейлса); р-уровни <0,05 рассматривались как статистически значимые.

Результаты.

Как видно из табл. 6, 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид и N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамид значительно снижали время неподвижности животного в течение 3-6-минутного теста на плавание. Эффективность этих соединений уступала эффективности антидепрессантной дозы имипрамина-НСI, но все же была сравнимой с эффективностью этой дозы. В противоположность этому, антипсихотическое средство оланзапин давал лишь слабый эффект в данном тесте, что соответствовало наблюдениям, указывающим на то, что это соединение обладает неадекватным действием на негативные симптомы у человека. Полученные данные подтвердили антипсихотический потенциал 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамида и N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамида, который может быть определен как потенциал, направленный на устранение негативных симптомов у пациентов с шизофренией.

Таблица 6

Влияние соединений на неподвижность мышей в тесте принудительного плавания

Доза: мг/кг	2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид, неподвижность в % (±ср. кв. от.)	N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамид, неподвижность в % (±ср. кв. от.)	Оланзапин, неподвижность в % (±ср. кв. от.)	Имипрамин-НСI, неподвижность в % (±ср. кв. от.)
Носитель	100(6,6)	100(6,6)	100(6,61)	100(7,1)
0,31	-	-	96(14)	-
1,3	97,5(6,3)	102(4,6)	95(11)	-
2,5	97(6,7)	96,7(7,5)	-	-
5,0	81,0(18)*	82,3(20)*	-	-
40	-	-	-	73,8(22)*

Пример 6. Относительный поток через KCNQ2-канал.

В данном примере описан протокол скрининга KCNQ2 для оценки соединений согласно изобретению. Этот анализ проводили для измерения относительного потока через KCNQ2-канал и осуществляли методом, описанным Tang et al. (Tang, W. et. al., J. Biomol. Screen. 2001, 6, 325-331) для калиевых hERG-каналов с указанными ниже модификациями.

В день эксперимента нужное число клеток CHO, стабильно экспрессирующих потенциал-зависимые мембранные KCNQ2-каналы, засеивали с плотностью, достаточной для получения монокультурного слоя. Клетки высевали за один день до проведения эксперимента и эти клетки обрабатывали 1 мкКи/мл [⁸⁶Rb] в течение ночи. В день проведения эксперимента клетки промывали HBSS-содержащим буфером. Клетки предварительно инкубировали с лекарственным средством в течение 30 мин и выходящий поток ⁸⁶Rb⁺ стимулировали субмаксимальной концентрацией 15 мМ КСI при постоянном присутствии лекарственного средства в течение еще 30 мин. После соответствующего инкубирования супернатант удаляли и число клеток подсчитывали в жидкостном сцинтилляционном счетчике (Tricarb). Клетки подвергали лизису путем добавления 2 мм NaOH и вычисляли количество ⁸⁶Rb⁺. Относительный поток вычисляли по формуле

$$\left(\frac{\text{CPM}_{\text{супер}}}{\text{CPM}_{\text{супер}} + \text{CPM}_{\text{клеток}}} \right)_{\text{соед}} / \left(\frac{\text{CPM}_{\text{супер}}}{\text{CPM}_{\text{супер}} + \text{CPM}_{\text{клеток}}} \right)_{15\text{мМ КСI}} * 100 - 100.$$

Соединения согласно изобретению имеют величину EC₅₀, составляющую менее чем 20000 нМ, в большинстве случаев менее чем 2000 нМ, а во многих случаях менее чем 200 нМ. В соответствии с этим считается, что соединения согласно изобретению могут быть использованы для лечения заболеваний, ассоциированных с калиевыми каналами семейства KCNQ.

Все непатентные материалы, патенты и публикации патентных заявок, цитируемые и обсуждаемые в настоящем изобретении, во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки так, как если бы каждый из этих материалов был введен отдельно посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение соединения для получения фармацевтической композиции для лечения или ослабления симптомов шизофрении, где соединение выбрано из группы, состоящей из этилового эфира N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты; 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамида; N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамида; N-(4,6-диметил-2-морфолин-4-илпиримидин-5-ил)-2-(4-фторфенил)ацетамида; (2,6-дифтор-4-морфолин-4-илфенил)амида гексановой кислоты; 2-циклопентил-N-(4,6-диметил-2-морфолин-4-илпиримидин-5-ил)ацетамида; N-(2-бром-4-морфолин-4-ил-6-трифторметилфенил)пропионамида; N-(2,4-диметил-6-морфолин-4-илпиридин-3-ил)-3,3-диметилбутирамида; этилового эфира [2-амино-4-(2,4,6-триметилбензиламино)фенил]карбаминовой кислоты и 2-циклопентил-N-(2-метокси-6-метил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамида, или его фармацевтически приемлемой соли.
2. Применение по п.1, где соединение представляет собой этиловый эфир N-(2-амино-4-(4-фторбензиламино)фенил)карбаминовой кислоты или его фармацевтически приемлемую соль.
3. Применение по п.1, где соединение представляет собой 2-циклопентил-N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)ацетамид или его фармацевтически приемлемую соль.
4. Применение по п.1, где соединение представляет собой N-(2,6-диметил-4-морфолин-4-илфенил)-3,3-диметилбутирамид или его фармацевтически приемлемую соль.
5. Применение по п.1, где соединение представляет собой N-(4,6-диметил-2-морфолин-4-илпиримидин-5-ил)-2-(4-фторфенил)ацетамид или его фармацевтически приемлемую соль.
6. Применение по п.1, где соединение представляет собой N-(2,4-диметил-6-морфолин-4-илпиридин-3-ил)-3,3-диметилбутирамид или его фармацевтически приемлемую соль.
7. Применение по любому из пп.1-6, где позитивные симптомы шизофрении ослабляются.
8. Применение по любому из пп.1-6, где негативные симптомы шизофрении ослабляются.
9. Применение по любому из пп.1-6, где когнитивные симптомы шизофрении ослабляются.
10. Применение по любому из пп.1-6, где один или несколько из позитивных, негативных и когнитивных симптомов шизофрении ослабляются.
11. Применение по любому из пп.1-6, где симптомы шизофрении одного или нескольких подтипов, выбранные из группы, состоящей из симптомов кататонической шизофрении, параноидной шизофрении, дезорганизованной шизофрении и резидуальной шизофрении, ослабляются.

