



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/4164 (2025.08); A61P 9/00 (2025.08); C07D 233/88 (2025.08)

(21)(22) Заявка: 2025118657, 07.07.2025

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.07.2025

Дата регистрации:
11.12.2025

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.07.2025

(45) Опубликовано: 11.12.2025 Бюл. № 35

Адрес для переписки:

620062, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19, УрФУ,
Центр интеллектуальной собственности,
Маркс Т.В.

(72) Автор(ы):

Нелюбина Анна Андреевна (RU),
Акулов Алексей Александрович (RU),
Вараксин Михаил Викторович (RU),
Буторин Илья Игоревич (RU),
Чупахин Олег Николаевич (RU),
Покровский Михаил Владимирович (RU),
Пученкова Олеся Андреевна (RU),
Корокин Михаил Викторович (RU),
Щеблыкина Олеся Викторовна (RU),
Костина Дарья Александровна (RU),
Нестеров Аркадий Витальевич (RU),
Мухамедов Денис Юсупович (RU),
Лебедев Петр Романович (RU),
Гудырев Олег Сергеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Уральский федеральный
университет имени первого Президента
России Б.Н. Ельцина" (RU),
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (RU)

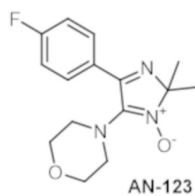
(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: MALAMAS M.S. et al. Highly Potent,
Selective, and Orally Active Phosphodiesterase
10A Inhibitors, J. Med. Chem., 2011, v. 54, iss. 21,
p. 7621-7638. ПУЧЕНКОВА О.А. и др.
Исследование острой токсичности, эндотелио-
и кардиопротективных свойств фенольных и
тиофенольных производных 2Н-имидазолов,
Фармация и фармакология, 2024, т. 12, N. 6,
стр. (см. прод.)

(54) 2,2-ДИМЕТИЛ-5-МОРФОЛИНО-4-(4-ФТОРФЕНИЛ)-2Н-ИМИДАЗОЛ-1-ОКСИД, ОБЛАДАЮЩИЙ
ЭНДОТЕЛИО- И КАРДИОПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области органической и медицинской химии, а именно к соединению 2,2-диметил-5-морфолино-4-(4-фторфенил)-2*H*-имидазол-1-оксида (AN-123). Предложенное соединение обладает хорошей водорастворимостью, относительно низкой токсичностью, эндотелио- и кардиопротективной

активностью. 4 ил., 1 табл., 4 пр.



(56) (продолжение):

394-409. AKULOV A.A. et al. Iodine-Catalyzed Radical C-H Amination of Nonaromatic Imidazole Oxides: Access to Cyclic α -Aminonitrones, The Journal of Organic Chemistry, 2024, v. 89, iss. 1, p. 463-473. MALAMAS M.S. et al. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2012, v.22, iss. 18, p. 5876-5884. WO 2007078813 A, 12.07.2007.

R U 2 8 5 2 6 5 7 C 1

R U 2 8 5 2 6 5 7 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07D 233/88 (2006.01)

A61K 31/4164 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 31/4164 (2025.08); A61P 9/00 (2025.08); C07D 233/88 (2025.08)

(21)(22) Application: 2025118657, 07.07.2025

(24) Effective date for property rights:
07.07.2025Registration date:
11.12.2025

Priority:

(22) Date of filing: 07.07.2025

(45) Date of publication: 11.12.2025 Bull. № 35

Mail address:

620062, g. Ekaterinburg, ul. Mira, 19, UrFU, Tsentr
intellektualnoj sobstvennosti, Marks T.V.

(72) Inventor(s):

Neliubina Anna Andreevna (RU),
Akulov Aleksei Aleksandrovich (RU),
Varaksin Mikhail Viktorovich (RU),
Butorin Ilia Igorevich (RU),
Chupakhin Oleg Nikolaevich (RU),
Pokrovskii Mikhail Vladimirovich (RU),
Puchenkova Olesia Andreevna (RU),
Korokin Mikhail Viktorovich (RU),
Shcheblykina Olesia Viktorovna (RU),
Kostina Daria Aleksandrovna (RU),
Nesterov Arkadii Vitalevich (RU),
Mukhamedov Denis Iusupovich (RU),
Lebedev Petr Romanovich (RU),
Gudyrev Oleg Sergeevich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal State Autonomous Educational
Institution of Higher Education Ural Federal
University named after the first President of
Russia B.N.Yeltsin (RU),
Federal State Autonomous Educational
Institution of Higher Education Belgorod
National Research University (RU)

(54) 2,2-DIMETHYL-5-MORPHOLINO-4-(4-FLUOROPHENYL)-2H-IMIDAZOLE-1-OXIDE, POSSESSING
ENDOTHELIAL AND CARDIOPROTECTIVE ACTIVITY

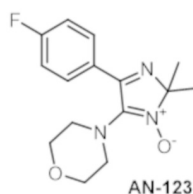
(57) Abstract:

FIELD: organic chemistry; medical chemistry.

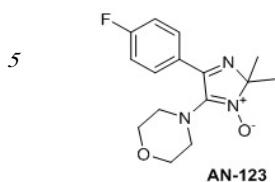
SUBSTANCE: invention relates to the field of
organic and medical chemistry, namely to the compound
2,2-dimethyl-5-morpholino-4-(4-fluorophenyl)-2H-
imidazole-1-oxide (AN-123).

EFFECT: good water solubility, relatively low
toxicity, endothelial and cardioprotective activity.

1 cl, 4 dwg, 1 tbl, 4 ex



Изобретение относится к области органической и медицинской химии, а именно к синтезу и применению соединения 2,2-диметил-5-морфолино-4-(4-фторфенил)-2*H*-имидазол-1-оксид (AN-123) в качестве эндотелио- и кардиопротективного средства.



Сердечно-сосудистые заболевания являются главной причиной смертности во всем мире, унося ежегодно жизни множества миллионов человек. Профилактика и терапия сердечно-сосудистых заболеваний являются одной из наиболее перспективных отраслей современной фармакологии. Эндотелий имеет решающее значение для поддержания физиологического равновесия в сосудистой системе. Эндотелиальные клетки синтезируют и высвобождают множество биологически активных веществ, действие которых разнонаправленно, но сбалансировано. Нарушение баланса и приводит к развитию эндотелиальной дисфункции (ЭД). Учитывая главенствующую роль эндотелиальной дисфункции в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, разработка таргетной фармакологической коррекции данной патологии является предметный интерес для современной фармакологии. На сегодняшний день в клинической практике не существует препаратов целенаправленного эндотелиопротективного действия. Для данной функции используются плеiotропные свойства лекарств различных групп - статинов, ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента, бета-адреноблокаторов, блокаторов кальциевых каналов, противодиабетических, противовоспалительных препаратов и других.

Разработка лекарственных препаратов неотъемлемым образом связана с постоянным поиском, усовершенствованием существующих, а также развитием новых методов и подходов направленного конструирования органических молекул. Среди множества известных веществ особое место по праву занимают азагетероциклические системы, лежащие в основе множества эффективных химико-фармацевтических препаратов, нашедших широкое распространение в диагностике и терапии инфекционных, онкологических, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и других социально-значимых заболеваний.

В этой связи одной из актуальных проблем экспериментальной фармакологии и современной медицинской науки в целом является поиск новых высокоэффективных и безопасных лекарственных средств с эндотелиопротективной и кардиопротективной активностью.

Задача, на решение которой направлено изобретение, заключается в установлении безопасности вещества, эндотелиопротективной и кардиопротективной активности среди вновь синтезированных азагетероциклических соединений.

Поставленная задача решается применением соединения AN-123, название по IUPAC: 2,2-диметил-5-морфолино-4-(4-фторфенил)-2*H*-имидазол-1-оксид, в качестве эндотелиопротективного и кардиопротективного средства, способствующего коррекции эндотелиальной дисфункции и сохранению функциональных возможностей миокарда.

Соединение AN-123 синтезировано впервые в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина». Все используемые реагенты и растворители, если не указано иное, приобретены из коммерческих источников (Sigma-Aldrich[®], Alfa Aesar[®], Lancaster[®], ЭКОС-1[®], Реахим[®],

Химреактивнаб[®]) и использованы без дальнейшей очистки. Все реакции проведены в атмосфере воздуха. Спектры ЯМР зарегистрированы на спектрометре Bruker Avance Neo 600 (частоты 600/151/565 МГц для спектров ¹H/¹³C/¹⁹F) с использованием ДМСО-d₆ в качестве дейтерированного растворителя; химические сдвиги приведены в δ-шкале (м.д.), калибровка сигналов осуществлялась относительно пика остаточного недеитерированного растворителя (2,5 м.д. для ¹H ЯМР и 39,52 м.д. для ¹³C ЯМР в ДМСО-d₆). Спектры ¹³C ЯМР для характеризуемых соединений записаны в режиме ВВ (broadband) с полной развязкой от протонов. Аббревиатуры, используемые при описании ЯМР-спектров: с - синглет, д - дублет, т - триплет, м - мультиплет, J (Гц) - константа спин-спинового взаимодействия (КССВ), J^F (Гц) - КССВ с ядрами атомов фтора. Масс-спектры зарегистрированы на масс-спектрометре SHIMADZU GCMS-QP2010 Ultra с ионизацией образца электронным ударом (ЭУ, 70 эВ). Элементный анализ выполнен на элементном анализаторе PerkinElmer CHN PE 2400 II (границы абсолютной погрешности измерений: ±0,3%). Ход реакций контролировался с помощью метода тонкослойной хроматографии на 0,25 мм пластинах с силикагелем (Merck 60F 254), визуализацию проводили с помощью УФ камеры (λ = 254 нм). Флэш-хроматографию осуществляли на силикагеле Macherey-Nagel 60, 0,063-0,2 мм или оксиде алюминия Macherey-Nagel 90, 0,063-0,2 мм, активир., осн.

Согласно скринингу in silico, наиболее близкими по своей структуре и фармакофорному профилю к предлагаемому соединению являются микромолярные ингибиторы PDE5a - ChEMBL1916091 [Malamas, M. S.; Ni, Y.; Erdei, J.; Stange, H.; Schindler, R.; Lankau, H.-J.; Grunwald, C.; Fan, K. Y.; Parris, K.; Langen, B.; Egerland, U.; Hage, T.; Marquis, K. L.; Grauer, S.; Brennan, J.; Navarra, R.; Graf, R.; Harrison, B. L.; Robichaud, A.; Kronbach, T.; Pangalos, M. N.; Hoefgen, N.; Brandon, N. J. J. Med. Chem. 2011, 54 (21), 7621-7638. DOI: 10.1021/jm2009138] и ChEMBL2070633 [Malamas, M. S.; Stange, H.; Schindler, R.; Lankau, H.-J.; Grunwald, C.; Langen, B.; Egerland, U.; Hage, T.; Ni, Y.; Erdei, J.; Fan, K. Y.; Parris, K.; Marquis, K. L.; Grauer, S.; Brennan, J.; Navarra, R.; Graf, R.; Harrison, B. L.; Robichaud, A.; Kronbach, T.; Pangalos, M. N.; Brandon, N. J.; Hoefgen, N. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012, 22 (18), 5876-5884. DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.07.076]. В отличие от существующих аналогов, соединение AN-123 обладает лучшей растворимостью и гидрофильностью при отсутствии вероятных off-target-взаимодействий с белками класса цитохромов P450 [Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. Sci. Rep. 2017, 7 (1), 42717. DOI: 10.1038/srep42717].

Впервые установлено, что соединение AN-123 проявляет эндотелиопротективное и кардиопротективное действие в эксперименте на половозрелых мышах на модели L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции.

Фигуры и их описание

Фиг. 1. Схема синтеза соединения AN-123.

Фиг. 2. Показатели систолического и диастолического артериального давления в экспериментальных группах. Примечание: **p < 0,05 при сравнении с группой L-NAME.

Фиг. 3. Показатели коэффициента эндотелиальной дисфункции в экспериментальных группах.

Примечание: **p < 0,05 при сравнении с группой L-NAME.

Фиг. 4. Динамика левожелудочкового давления в экспериментальных группах пробой с нагрузкой объемом и на адренореактивность. Примечание: **p < 0,05 при сравнении с группой L-NAME.

Синтез и фармакологические свойства заявленного соединения

Пример 1. Виртуальный скрининг

Предварительно осуществленный виртуальный скрининг методом молекулярного докинга показал, что прототип AN-123 может ингибировать белки класса

фосфодиэстераз, в частности PDE5a, вследствие чего способен оказывать эндотелио-

и кардиопротективное действие [(a) Gebbska, M. A.; Stevenson, B. K.; Hemnes, A. R.; Bivalacqua, T. J.; Haile, A.; Hesketh, G. G.; Murray, C. I.; Zaiman, A. L.; Halushka, M. K.; Krongkaew, N.; Strong, T. D.; Cooke, C. A.; El-Haddad, H.; Tudor, R. M.; Berkowitz, D. E.; Champion, H. C. *Cardiovasc. Res.* 2011, 90 (2), 353-363. DOI: 10.1093/cvr/cvq410; (b) Kass, D. A.; Champion, H. C.; Beavo, J. A. *Circ. Res.* 2007, 101 (11), 1084-1095. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.162511].

Пример 2. Синтез соединения AN-123

Соединение AN-123 получено в соответствии со схемой синтеза, представленной на Фиг. 2. Синтез ведется из оксима 2-(4-фторфенил)-2-оксоацетальдегида 1, полученного

по ранее описанной методике [Kozhevnikov, V. N.; Kozhevnikov, D. N.; Shabunina, O. V.; Rusinov, V. L.; Chupakhin, O. N. *Tetrahedron Lett.* 2005, 46 (11), 1791-1793. DOI: 10.1016/j.tetlet.2005.01.135]. Конденсация (1) с ацетоном 2 и ацетатом аммония 3 в уксусной кислоте приводит к образованию полупродукта 4. Последний подвергается реакции кросс-дегидрогенативного сочетания с морфолином 5 в присутствии молекулярного иода, в каталитическом количестве, трет-бутилгидропероксида 70% водн. р-р (далее - ТВНР), и уксусной кислоты в 2-метилтетрагидрофуране (далее - 2-МТГФ) [Akulov, A. A.; Varaksin, M. V.; Nelyubina, A. A.; Tsmokaluk, A. N.; Mazhukin, D. G.; Tikhonov, A. Y.; Charushin, V. N.; Chupakhin, O. N. *J. Org. Chem.* 2024, 89(1), 463-473. DOI: 10.1021/acs.joc.3c02230] с получением соединения AN-123. Строение вещества AN-123, а также ранее не описанного полупродукта 4 подтверждено методами спектроскопии ЯМР ^1H , ^{13}C и ^{19}F , масс-спектрометрии и элементного анализа.

Методика получения соединения AN-123

Стадия 1. Получение 2,2-диметил-4-(4-фторфенил)-2Н-имидазол-1-оксида 4

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником и магнитным якорем, помещают 2-(4-фторфенил)-2-оксоацетальдегид 1 (1,2 г; 7,2 ммоль; 1,0 экв.), ацетат аммония 3 (3,33 г; 43,2 ммоль; 6,0 экв.), ацетон 2 (6,87 мл; 93,6 ммоль; 13,0 экв.) и уксусную кислоту (4,9 мл). Смесь нагревают на глицериновой бане до 60°C и перемешивают при этой температуре в течение 4 ч. Далее реакционную массу выливают в 240 мл воды и экстрагируют дихлорметаном 3×100 мл, промывают экстракт 10% водным раствором NaOH 100 мл, органический слой сушат над безводным сульфатом натрия, после чего упаривают растворитель при пониженном давлении. Остаток подвергают флэш-хроматографии на оксиде алюминия. Условия элюирования: 150-200 мл дихлорметана для отделения непрореагировавших исходных материалов и/или побочных продуктов. Элюат концентрируют при пониженном давлении и полученный остаток перекристаллизовывают из гексана для получения чистого полупродукта 2,2-диметил-4-(4-фторфенил)-2Н-имидазол-1-оксид (4).

Выход: 1,23 г (81,9 %), кристаллическое вещество кремового оттенка, т.пл. 180-182°C.

$R_f = 0,4$ (этилацетат: гексан, 1:1). Спектр ЯМР ^1H (600 МГц, ДМСО- d_6), δ , м.д.: 1,47 (с, 6H); 7,36-7,41 (м, 2H); 8,05-8,10 (м, 2H); 8,40 (с, 1H). Спектр ЯМР $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (151 МГц, ДМСО- d_6), δ , м.д.: 24,1; 101,2; 116,1 (д, $^2J^F = 21,8$ Гц); 125,5; 127,6 (д, $^4J^F = 3,2$ Гц); 129,8 (д, $^3J^F = 9,2$ Гц); 163,7; 164,2 (д, $^1J^F = 250,5$ Гц). Спектр ЯМР ^{19}F (565 МГц, ДМСО- d_6),

δ , м.д.: -108,2-(-108,1) (м). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн.}}$, %): 206 $[M]^+$ (100), 207 $[M+1]^+$ (13).
Найдено, %: 64,22; Н, 5,36; N, 13,41. Вычислено, % для $C_{11}H_{11}FN_2O$: С, 64,07; Н, 5,38; N, 13,58.

Стадия 2. Получение 2,2-диметил-5-морфолино-4-(4-фторфенил)-2*H*-имидазол-1-оксида (AN-123)

В колбу Эрленмейера из прозрачного стекла, снабженную магнитным якорем, последовательно помещают 2-МеТГФ в объеме 2,6 мл, ледяную уксусную кислоту в объеме 0,445 мл; 7,8 ммоль; 3,0 экв. и ТВНР в объеме 0,383 мл 70%-ного водн. раствора; 5,2 ммоль; 2,0 экв. К этому раствору добавляют молекулярный иод в количестве 66 мг; 0,26 ммоль; 0,1 экв. и еще 2,6 мл 2-МеТГФ. Далее в колбу помещают морфолин 5 в объеме 0,450 мл; 5,2 ммоль; 2,0 экв. и 2,2-диметил-4-(4-фторфенил)-2*H*-имидазол-1-оксид 4 в количестве 540 мг; 2,6 ммоль; 1,0 экв., после чего полученную смесь разбавляют еще 2,6 мл 2-МеТГФ, таким образом, общий объем растворителя составляет 7,8 мл. Реакционную массу выдерживают при комнатной температуре в течение 12 ч. По завершении реакции смесь гасят насыщенными водными растворами Na_2SO_3 в объеме 20 мл и $NaHCO_3$ в объеме 20 мл, затем экстрагируют дихлорметаном 5×20 мл.

Органический экстракт сушат над безводным сульфатом натрия, после чего упаривают растворитель при пониженном давлении. Остаток подвергают флэш-хроматографии на силикагеле, в результате чего получают чистый продукт AN-123. Условия элюирования: 150 мл ацетонитрила для отделения непрореагировавших исходных материалов и/или побочных продуктов, затем 100 мл системы хлороформ: метанол 9:1 для элюирования продукта 2,2-диметил-5-морфолино-4-(4-фторфенил)-2*H*-имидазол-1-оксид (AN-123).

Выход: 500 мг (66 %), желтый порошок, т.пл. 118-120°C. R_f = 0,25 (ацетонитрил: этанол, 9:1). Спектр ЯМР 1H (600 МГц, $DMCO-d_6$), δ , м.д.: 1,43 (с, 6H); 3,19 (т, J = 4,7 Гц, 4H); 3,63 (т, J = 4,7 Гц, 4H); 7,35-7,40 (м, 2H); 7,96-8,04 (м, 2H). Спектр ЯМР $^{13}C\{^1H\}$ (151 МГц, $DMCO-d_6$), δ , м.д.: 24,1; 47,3; 66,3; 94,2; 115,7 (д, $^2J^F$ = 21,8 Гц); 129,0; 130,0 (д, $^3J^F$ = 8,8 Гц); 138,9; 161,9; 163,6 (д, $^1J^F$ = 248,5 Гц). Спектр ЯМР ^{19}F (565 МГц, $DMCO-d_6$), δ , м.д.: -109,4. Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн.}}$, %): 291 $[M]^+$ (100), 292 $[M+1]^+$ (19). Найдено, %: 61,67; Н, 6,29; N, 14,31. Вычислено, % для $C_{15}H_{18}FN_3O_2$: С, 61,84; Н, 6,23; N, 14,42.

Пример 3. Исследование острой токсичности

Изучение острой токсичности проводили в лаборатории кафедры фармакологии и клинической фармакологии Белгородского государственного национального исследовательского университета на лабораторных мышах линии C57bl/6 (виргинных самках) в возрасте 8-10 недель массой 18-22 грамм без внешних признаков заболевания, прошедших режим 14-дневного карантина.

Исследования острой токсичности проводились согласно межгосударственному стандарту ГОСТ 32644-2014 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность - метод определения класса острой токсичности» (OECD, Test № 423). По результатам указанных работ определялся класс токсичности в соответствии с Согласованной на глобальном уровне системе классификации опасности и маркировки химической продукции, вызывающей острую токсичность. Выбор начальной дозы составил 2000 мг/кг массы тела для настоящего исследования. Соединение AN-123 вводилось в объеме 0,5 мл/100 г массы тела через

зонд в желудок с помощью атравматичного желудочного зонда. В качестве растворителя использовали стерильную воду. Контрольной группе вводили воду внутрижелудочно в эквивалентных количествах. Наблюдение за мышами осуществлялось на протяжении 14 дней. В течение двух часов после введения препарата каждая особь находилась под индивидуальным непрерывным наблюдением. Затем до 12 часов периодичность индивидуального обследования составляла каждые 60 минут, в дальнейшем ежедневно каждые 12 часов все 14 дней. Наблюдение включало оценку общего состояния с фиксацией клиники отравления: изменения кожи и шерсти, глаз и слизистых оболочек, оценка дыхательной, кровеносной, вегетативной и центральной нервной систем, а также соматомоторную активность и характер поведения. Также проводили подсчет числа мышей, погибших в ходе эксперимента. Умерших в ходе эксперимента мышей подвергали вскрытию для дальнейшей аутопсии.

Через 20-25 минут после введения соединения 2,2-диметил-5-морфолино-4-(4-фторфенил)-2*H*-имидазол-1-оксид из расчета 2000 мг/кг массы тела отмечалось снижение активности мышей и нарушение координации движений, наблюдались маневренные движения по кругу, частота дыхательных движений увеличивалась, а глубина уменьшалась, наблюдалась взъерошенность шерстного покрова, шерсть теряла гладкость и блеск. Через 40 минут после затравки наблюдалась общая заторможенность, снижался тонус скелетных мышц, реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители (мышы лежали, не поднимались, одергивали лапы и моргали при механическом раздражении). Через 60-80 минут после затравки начинался регресс патологической неврологической симптоматики, однако мышы оставались вялыми и малоподвижными на протяжении всего оставшегося периода наблюдения. К концу 7-х суток наблюдалась сгорбленная поза у части мышы, шерстяной покров терял блеск и гладкость, мышы значительно теряли в массе тела. Однако летальных исходов не было зафиксировано на протяжении всего периода наблюдения. По результатам вскрытия каких-либо патологических изменений внутренних органов мышы данной группы не было обнаружено, общая гистологическая картина соответствовала результатам контрольной группы.

Таким образом, мышам в количестве 3 штук вводили начальную дозу 2000 мг/кг, учитывая, что за весь период наблюдения (14 дней) не было зафиксировано ни одного летального случая, данная доза вводилась повторно еще 3 мышам. Меньшие дозировки не вводились. При повторном введении той же дозы также за весь период наблюдения не было зафиксировано ни одного летального случая.

Из вышесказанного следует, что данное соединение относится к 5 классу токсичности - $LD_{50} \approx 5000$ мг/кг. В высоких дозах, близких к LD_{50} , изучаемая малая молекула обладает выраженной нейротоксичностью.

Пример 4. Исследование эндотелио- и кардиопротективной активности

Для изучения эндотелио- и кардиопротективных свойств проводилось исследование на мышах-самцах линии C57Bl/6 в возрасте 8-10 недель массой 18-22 грамм без внешних признаков заболевания, прошедших режим 14-дневного карантина.

Эксперименты проведены с соблюдением требований Федерального закона от 27.12.2018 № 498-ФЗ «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации», правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и ГОСТ Р 53434-2009), директивы Европейского сообщества (86/609 ЕС), правил Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997) и Правил

надлежащей лабораторной практики (утв. приказ МЗ РФ № 199н от 01.04.2016 г.).

Для моделирования ЭД применяли индуктор эндотелиальной дисфункции - неселективный блокатор NO-синтазы N-нитро-L-аргинина метиловый эфир (L-NAME), который вводился внутривентально ежедневно 1 раз в сутки в дозе 60 мг/кг в течение 7 дней. Для коррекции ЭД, исследуемое соединение AN-123 вводили 1 раз в сутки внутривентально с использованием зонда для мелких лабораторных животных. Соединение AN-123 вводили в дозе равной 1/10 от LD₅₀. Для данной молекулы доза составила 500 мг/кг.

Развитие ЭД у мышей, а также степень ее коррекции изучаемым препаратом оценивали путем неинвазивного измерения кровяного давления на хвосте грызунов, а также используя расчетный коэффициент эндотелиальной дисфункции (КЭД).

Измерение давления производили в день выведения мышей на 8-е сутки эксперимента на аппарате «Систола» фирмы Нейроботикс (Москва, Зеленоград). Далее мышам после предварительной наркотизации Золазепамом 2,5 мг/100 г и Ксилазином 2 мг/100 г внутривентально, измеряли скорость кровотока в сонной артерии с последующим проведением внутривенных функциональных проб с ацетилхолином (АХ) и нитропруссидом натрия (НП), которые используют для оценки эндотелий-зависимой и эндотелий-независимой вазодилатации соответственно и расчета КЭД. Показатели гемодинамики измеряли непрерывно посредством периваскулярного датчика флоуметра «Transonic Systems» фирмы BIOPAC Systems (США).

Изучение сократимости миокарда после моделирования ЭД проводили у наркотизированных мышей, находящихся на управляемом дыхании. Полость левого желудочка зондировали иглой через верхушку сердца и посредством датчика RX104A «Biopac Systems, Inc.» и с помощью компьютерной программы «Biopac Systems, Inc.» (США) регистрировали показатели кардиогемодинамики: давление в левом желудочке, ЧСС. Для оценки функциональных возможностей миокарда у мышей проводили нагрузочные пробы: с нагрузкой объемом, пробу на адренореактивность, выполненную путем внутривенного одномоментного введения раствора адреналина гидрохлорида 1×10^{-5} моль/л и пробу с нагрузкой сопротивлением, выполненную путем пережатие восходящей аорты на 30 сек).

Статистический анализ

Все полученные данные были подвергнуты статистической обработке с использованием пакета программ Microsoft Excel 2010. Используя методы описательной статистики, данные были проверены на соответствие закону нормального распределения с применением критерия Шапиро-Уилка. Также рассчитывали относительные и средние величины: среднее арифметическое (M), медиана (Me), стандартное отклонение (SD), межквартильный интервал. При нормальном распределении данные были представлены в виде $M \pm SD$. Учитывая нормальный тип распределения данных для сравнения двух выборок использовался критерий Стьюдента. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Так, например, в интактной группе уровень систолического артериального давления (САД) составил $106,5 \pm 3,5$ мм рт.ст., диастолического артериального давления (ДАД) $64,3 \pm 3,3$ мм рт.ст. В контрольной группе с введением L-NAME САД $147,5 \pm 4,2$ мм рт.ст., ДАД $89,5 \pm 3,8$ мм рт.ст. В группе с исследуемым препаратом САД составил $114,3 \pm 10^{**}$ мм рт.ст., ДАД $69,2 \pm 4^{**}$ мм рт.ст., что по всем представленным показателям показало статистически значимый результат в сравнении с группой L-NAME ($p < 0,05$) (Фиг. 2).

Моделирование L-NAME-индуцированной ЭД приводило к формированию артериальной гипертензии и росту систолического давления более чем в 1,35 раза. О

развитии указанных изменений свидетельствовал статистически достоверный ($p < 0,05$) рост КЭД более чем в 4 раза по сравнению с интактными мышами (Фиг. 3).

Следующим этапом были оценены функциональные возможности миокарда при проведении нагрузочных проб: с перегрузкой объемом, на адренореактивность и при нагрузке сопротивлением. Введение L-NAME в течение 7 дней в дозе 60 мг/кг приводило к снижению миокардиального резерва: отмечалось повышение давления в левом желудочке при проведении пробы на адренореактивность, более выраженный рост систолического давления в левом желудочке при перегрузке объемом и достоверное падение сократимости миокарда с 5 по 25 секунду пережатия аорты (Фиг. 4). Изучаемая малая молекула продемонстрировала статистически значимый кардиопротективный эффект в пробе с нагрузкой объемом и в пробе на адренореактивность (таблица 1).

Таблица 1 - Оценка функциональных возможностей миокарда при проведении нагрузочных проб в экспериментальных группах

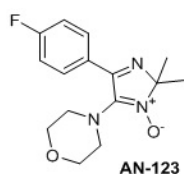
Экспериментальная группа (n = 6)	Нагрузка объемом, мм рт.ст.	Адрено-реактивность, мм рт.ст.	Нагрузка сопротивлением, %
Интактные	140,3±6,3	199,70±4,7	87,3±4,5
L-NAME	203,9±7,2*	254,65±8,5*	65,0±5,5*
L-NAME + AN-123, 500 мг/кг	151,0±9,9**	206,22±6,4**	81,3±6,4

Примечания: * $p < 0,05$ при сравнении с группой интактных мышей; ** $p < 0,05$ при сравнении с группой L-NAME.

Таким образом, азагетероциклическое соединение AN-123 [2,2-диметил-5-морфолино-4-(4-фторфенил)-2H-имидазол-1-оксид] обладает низкой токсичностью (5 класс) и имеет широкий терапевтический диапазон. Исследование фармакологической активности продемонстрировало, что данная молекула снижает кровяное давление, улучшает показатели гемодинамики и миокардиальный резерв в модели L-NAME-индуцированной ЭД. Таким образом, 5-морфолиносодержащее производное 2H-имидазола обладает выраженными эндотелио- и кардиопротективными свойствами и является перспективным соединением для коррекции ЭД при различных сердечно-сосудистых заболеваниях.

(57) Формула изобретения

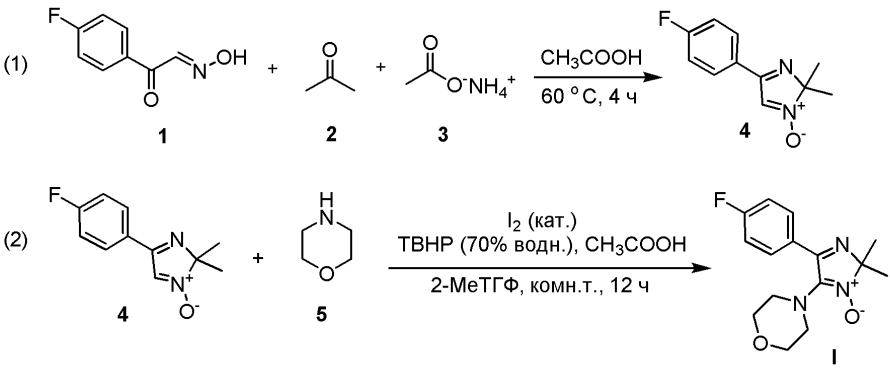
2,2-Диметил-5-морфолино-4-(4-фторфенил)-2H-имидазол-1-оксид формулы AN-123,



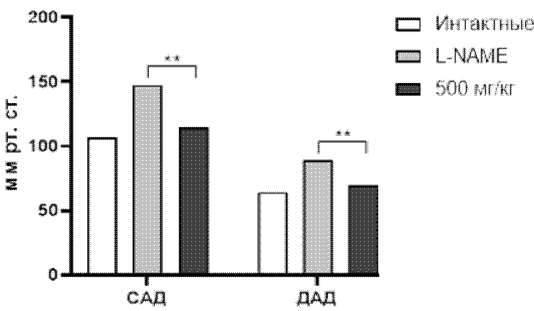
AN-123

обладающий эндотелио- и кардиопротективной активностью.

1

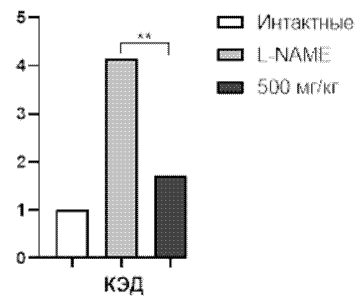


Фиг.1

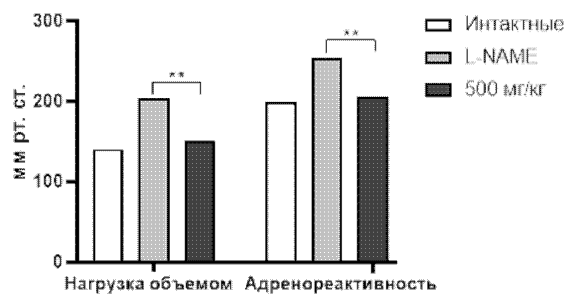


Фиг.2

2



Фиг.3



Фиг.4