



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **88773** (13) **C2**
(51) **МПК**
A61K 31/4439 (2009.01)
A61P 13/10 (2009.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

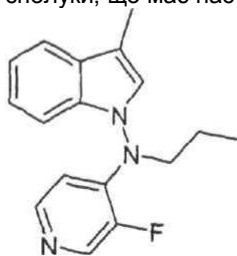
(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ПОДРАЗНЕННЯ СЕЧОВОГО МІХУРА ТА НАДМІРНО АКТИВНОГО СЕЧОВОГО МІХУРА

1

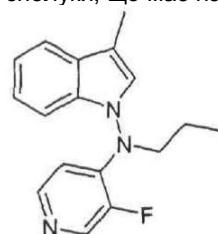
(21) а200603708
(22) 04.04.2006
(24) 25.11.2009
(31) 0119435.6
(32) 09.08.2001
(33) GB
(31) 60/268,846
(32) 15.02.2001
(33) US
(62) 2003098376, 14.02.2002
(46) 25.11.2009, Бюл.№ 22, 2009 р.
(72) СМІТ КРЕЙГ П., US, РЕТБОУН МІШЕЛЬ П.,
СА, ПЕТТІ МАРГАРЕТ, US, РЕМП ДЕВІД, US
(73) АВЕНТИС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ ІНК., US
(56) EP 0 683 165 A2, 22.11.1995
EP 0 287 982 A2, 26.10.1988
Choppin A, Eglen RM.: "Pharmacological
characterization of muscarinic receptors in mouse
isolated urinary bladder smooth muscle", Br J
Pharmacol., 2001 Aug;133(7):1035-40
UA 80394 C2, 17.11.2003
(57) 1. Спосіб лікування подразнення сечового
міхура, який включає введення пацієнту, який цьо-

2

го потребує, терапевтично ефективної кількості
сполуки, що має наступну формулу



2. Спосіб лікування надмірно активного сечового
міхура, який включає введення пацієнту, який цьо-
го потребує, терапевтично ефективної кількості
сполуки, що має наступну формулу



Розсіяний склероз (MS) являє собою дегене-
ративне і запальне неврологічне захворювання,
яке уражує центральну нервову систему, і пов'язане
з утворенням нейрональних бляшок і порушенням
нейрональної провідності внаслідок демієлініза-
ції (втрати мієліну). Подібно до цього, є дуже
багато повідомлень про велику демієлінізацію при
травмі спинного мозку та удари (Bunge et al., 1993;
Blight and DeCrescito, 1986; Pendlebury et al., 2000).

Фундаментальне дослідження в галузі фізіоло-
гії поширення потенціалу дії у мієлінізованих воло-
кнах показало, що блок проведення у демієлінізо-
ваних волокнах виникає частково внаслідок появи
чутливих до амінопіридину калієвих каналів в об-
ластях з втраченим мієліном (Bever 1996).

Потенціали дії поширюються вздовж нормаль-
них мієлінізованих нервових волокон за допомо-

гою процесу нормального проведення, яке забез-
печується натрієвим потоком, що виникає
внаслідок відкривання потенціалочутливих натріє-
вих каналів у перехопленні Ранв'є. Таким чином,
при початку електричної стимуляції іони натрію
(Na⁺) проникають у нейрон, додаючи нейрону
більш позитивний заряд. Коли позитивний заряд
нейрона досягає критичного рівня, спостерігається
"деполяризація". Деполяризація дозволяє позити-
вним ядрам іонів текти вниз по нейрону, вздовж
аксона і до кінця нерва. Для "встановлення на
нуль" самого нейрона надмірний позитивний заряд
повинен розсіятися. Це відбувається внаслідок
виходу назовні іонів калію (далі у цьому документі
"K⁺") через калієві канали. У випадку, коли мієлін
зруйнований, потенціалочутливі натрієві канали,
які відкриваються під час деполяризації, з'явля-

(13) **C2**

(11) **88773**

(19) **UA**

ються на аксолемі. Потік калію, що тече у зворотному напрямку до відношенню до потоку натрію, зменшує амплітуду і тривалість потенціалу дії, що здійснює свій внесок у недостатність проведення шляхом зменшення щільностей дистального ефективного потоку. Даний дефіцит проведення пов'язаний з симптомами, включаючи м'язову слабкість. Завдяки блокуванню виходу K^+ через калієві канали назовні, нейрон залишається у деполяризованому стані більш тривалий час і більш легко повторно стимулюється. Таким чином, вважають, що блокатори калієвих каналів є корисними для лікування захворювань і станів, при яких порушена передача потенціалу дії, таких як MS, травматичне пошкодження головного мозку (далі у цьому документі "TBI") і пошкодження спинного мозку (далі у цьому документі "SCI").

Блокатори калієвих каналів, такі як 4-амінопіридин (далі у цьому документі "4-AP"), збільшують тривалість і амплітуду потенціалу дії у демієлінізованих волокнах і поліпшують поширення потенціалу дії *in vitro* (Bostock et al., 1978; 1981; Targ and Kocsis, 1985; 1986; Shi and Blight, 1997), полегшують вивільнення нейромедіаторів (Bostock et al., 1981; Hirsh and Quandt, 1993; Sherratt et al., 1980) і посилюють скорочувальну здатність м'язів (Agoston et al., 1982; Savage et al., 1985). Дані спостереження припускають, що блокатори калієвих каналів, такі як 4-AP, можуть відновлювати проведення у демієлінізованих волокнах у пацієнтів з MS. Подальше клінічне випробування також підтвердило припущення про те, що лікування амінопіридином може поліпшити симптоми у деяких пацієнтів з MS (Jones et al., 1983; Stefoski et al., 1987; Davis et al., 1990; van Diemen et al., 1992; Bever et al., 1994; Schwid et al., 1997).

Описана також ефективність 4-AP при лікуванні неврологічних станів, включаючи SCI, зменшення хронічного болю і спазмів у пацієнтів з SCI, хворобу Альцгеймера, постполіомієлітний синдром, міастенію гравіс, хворобу Хантінгтона, вікові порушення пам'яті, посттравматичні, постінсультні або посттоксичні синдроми, які впливають на пам'ять або пізнавальну функцію, і сімейну вегетативну дисфункцію (Wurtman R.J. and Buyukuysal R., 1989; Hansebout R.R. and Blight A., 1996; Hansebout R.R. and Blight A., 1994). Були початі клінічні випробування по застосуванню фампридину-SR для лікування пацієнтів з довготривалими пошкодженнями спинного мозку (Potter et al., 1998a,b), незважаючи на проблеми, пов'язані з безпекою при застосуванні 4-AP у спільній популяції пацієнтів (Multiple Sclerosis, Cognos Study # 51, Decisions Resources, жовтень 1999р., стор.77-8). У декількох дослідженнях було показано, що одноразові дози 4-AP можуть відновити деякі функції у пацієнтів із SCI, якщо їх вводять через один рік або більше після пошкодження (Potter et al., 1998a,b; Qiao et al., 1997; Hayes et al., 1993; 1994). Також повідомляється про позитивні ефекти після тривалого застосування. Клінічно значимі функціональні поліпшення спостерігалися у 16 з 16 пацієнтів після 3 місяців щоденного перорального прийому 4-AP дозою 30мг/кг, у пацієнтів із SCI 2-річної давнини або більше. Деякі пацієнти, яких

раніше розцінювали як таких, що мають повне пошкодження, були перекласифіковані як такі, що мають рівень неповного пошкодження (Segal et al., 1999). У всіх пацієнтів спостерігалось у деякій мірі поліпшення відносно, принаймні, деякого типу неврологічної або легеневої функції через 3 місяці щоденного перорального лікування 4-AP (30мг на день або приблизно 0,5мг/кг). Більш низька доза була неактивною.

Як було сказано вище, 4-AP блокує калієві канали, ефективно пролонгуючи потенціал дії. На жаль, вказаний механізм, за допомогою якого блокатори калієвих каналів можуть поліпшувати симптоми, пов'язані із захворюваннями і станами, які порушують передачу потенціалу дії, може також викликати епілептоїдну активність. Дійсно, 4-AP являє собою визнаний агент, що викликає судороги у тварин і людини. Отже, придатність 4-AP як терапевтичного агента при MS, TBI і SCI обмежена його здатністю викликати судороги та іншими небажаними побічними ефектами. Повідомляється про збуджений стан, сплутаність свідомості і генералізовані тоніко-клонічні напади при застосуванні доз вище 0,8мг/кг (Ball et al., 1979; Bever et al., 1994). Van Diemen et al. (1993) повідомляють, що ступінь поліпшення у пацієнтів з MS (що визначається як збільшення відстані ходьби по рівній поверхні) достовірно пов'язаний з рівнем 4-AP у сироватці крові (33-75нг/мл необхідно для істотного поліпшення після перорального введення). Однак, при тих же дозах спостерігалися побічні ефекти (парестезія/дизестезія, запаморочення/відчуття пустоти у голові і навіть хитка хода). Внаслідок іншого дослідження на людях Bever et al. (1994) повідомляють про сильний епілептичний напад при рівні у сироватці крові 104нг/мл. Обидві групи дослідників припускають, що більш високі дози і рівні у сироватці крові повинні, ймовірно, викликати більше поліпшення у тих пацієнтів з MS, які реагували на більш низькі дози 4-AP. Таким чином, ступінь ефективності 4-AP обмежується дозою і побічними ефектами.

Проблеми, пов'язані з побічними ефектами через більш високі рівні 4-AP у сироватці крові, привели до розробки композицій з уповільненим вивільненням (фампридин-SR) (Masterson J.G. and Myers M., 1994; 1996a; 1996b). Фампридин-SR у наш час проходить 2 фазу клінічних випробувань на хворих з MS. У первинних клінічних випробуваннях фампридину-SR у пацієнтів спостерігалось поліпшення різних функцій. В залежності від індивідуума, вказані поліпшення включали поліпшення функцій сечового міхура, кишечника і статевої функції, зростання легкості у рухах та відчуттях і зменшення спазмів м'язів, стомлюваності і хронічного болю.

Інший підхід до усунення небажаних побічних ефектів, пов'язаних з 4-AP, полягає у спільному введенні 4-AP і блокаторів потенціалочутливих натрієвих каналів. Блокатори натрієвих (Na^+) каналів блокують вхідний потік іонів Na^+ і знижують чутливість нейрона до деполяризації. Це ефективно знижує збудливість нейронів. Дійсно, є повідомлення про те, що спільне введення блокаторів потенціалочутливих натрієвих каналів і 4-AP запо-

бігає індукованим 4-AP судорогам у мишей (Yamaguchi and Rogawski, 1992). 4-AP не володіє здатністю блокувати натрієві канали.

Сполуки, які застосовуються у способах, заявлених у даному винаході, можна синтезувати за допомогою методик, описаних у патенті США №4 970 218. Всі патенти та інші публікації, приведені у цьому документі, включені сюди як посилання.

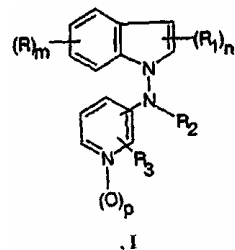
Відомо, що певні сполуки в обсязі даного винаходу можуть індукувати потенціалочутливу блокаду натрієвих каналів *in vitro* та *in vivo* (Tang et al., 1995; 1998; Tang and Kongsamut, 1996). Блокатори потенціалочутливих натрієвих каналів діють більш ефективно в умовах клітинної деполяризації. Вказані сполуки здійснюють незначну дію або не здійснюють її на нормальний процес проходження сигналів у нейронах, але дозволяють блокувати натрієві канали під час нападів, травми голови або ішемії. Велика кількість даних агентів здійснює церебропротективну дію на тваринних моделях вказаних патологічних станів (Madge et al., 1998).

Без обмеження рамками теорії, блокатори калієвих каналів являють собою також агенти, які мають право на існування, для лікування невропатичного болю і болю, зв'язаного з цитокінами, включаючи біль при артритах. Sweitzer et al. (1999) припустили, що активація мікроглії і вивільнення цитокінів можуть грати роль у гіпералгезії після периферичного запалення або пошкодження периферичних нервів. Блокатори калієвих каналів, такі як 4-AP, як повідомляють, блокують активацію мікроглії у щурів, мишей і людей (Eder, 1998). Руо et al. (1997) повідомляють, що 4-AP може зменшити вивільнення нітриту з активованої мікроглії, що вказує на можливість контролю над болем за допомогою даного механізму. Крім того, 4-AP, як повідомляють, зменшує індуковане ліпополісахаридами (LPS) продукування NO у мишачих макрофагах (Lowry et al., 1998). Введення LPS мишам використовують також як модельну систему для виявлення протиаартритної ефективності декількох різних агентів з різними механізмами дії (McClay et al., 2001). Було розроблено декілька експериментальних моделей, які включають здавлення сідничного нерва або спинномозкового нерва L5 або L6, для того, щоб вивчити невропатичний біль (Bennet and Xie, 1988; Seltzer et al., 1990; Kim and Chung, 1992).

У наш час встановлено, що сполуки формули I володіють властивістю блокувати калієві канали. Унікальна комбінація блокувальних властивостей як по відношенню до калієвих, так і по відношенню до натрієвих каналів, означає, що вказані сполуки є корисними як терапевтичні агенти для лікування демієлінізуючих захворювань або станів. Наприклад, вони є корисними для лікування MS, SCI, TBI (травматичного пошкодження головного мозку) і удару. Вказані сполуки являють собою більш безпечні терапевтичні агенти, ніж 4-AP, оскільки 4-AP блокує тільки калієві канали, що може приводити до небажаних побічних ефектів, таких як збуджений стан, сплутаність свідомості і напади. Сполуки формули I є також корисними для реабілітації після удару, лікування подразнення і дисфункції сечового міхура, лікування вісцерального, індукова-

ного хемокінами болю (включаючи артритний біль) і невропатичного болю.

Сполуки формули I володіють унікальною комбінацією блокувальних властивостей як відносно калієвих, так і натрієвих каналів. Вказані сполуки є корисними для лікування демієлінізуючих захворювань і станів, таких як розсіяний склероз, пошкодження спинного мозку, травматичне пошкодження головного мозку і удар. Сполуки також корисні для реабілітації після ударів, лікування подразнення і дисфункції сечового міхура, лікування вісцерального, індукованого хемокінами болю (включаючи артритний біль) і невропатичного болю.



де

m дорівнює 0, 1 або 2;

n дорівнює 0, 1 або 2;

p дорівнює 0 або 1;

кожний R незалежно являє собою водень, галоген, трифторметил, C₁-C₆алкіл, C₁-C₆алкокси, бензилокси, гідроксил, нітрогрупу або аміногрупу;

кожний R₁ незалежно являє собою водень, C₁-C₆алкіл, C₁-C₆алкеніл, C₁-C₆алканоліл, галоген, ціаногрупу, -C(O)C₁-C₆алкіл, -C₁-C₆алкіленCN, -C₁-C₆алкіленN'R'R'', де R' і R'' кожний незалежно являє собою водень або C₁-C₆алкіл,

-C₁-C₆алкіленOC(O)C₁-C₆алкіл або -CH(OH)R₄, де R₄ являє собою водень або C₁-C₆алкіл;

R₂ являє собою водень, C₁-C₆алкіл, необов'язково заміщений галогеном, гідрокси або бензилокси, C₁-C₆алкеніл, C₁-C₆алкініл,

-CO₂C₁-C₆алкіл або -R₅-NR'R'', де R₅ являє собою C₁-C₆алкілен, C₁-C₆алкенілен або C₁-C₆алкінілен, а R' і R'' кожний незалежно являє собою водень, C₁-C₆алкіл або, альтернативно, група -NR'R'' як ціле являє собою 1-піролідиніл; і

R₃ являє собою водень, нітрогрупу, аміногрупу, галоген, C₁-C₆алкокси, гідрокси або C₁-C₆алкіл.

Визначення:

1) Демієлінізуючі захворювання. У даному описі демієлінізуючі захворювання визначаються як такі захворювання, при яких мієлін є основною мішенню. Вони поділяються на дві головні групи: набуті захворювання і спадкові метаболічні порушення.

Розсіяний склероз підпадає під категорію набутого захворювання. Розсіяний склероз звичайно виявляється між 20-м і 50-м роками життя. MS уражує білу речовину центральної нервової системи. У своєму класичному виявленні (90% всіх випадків) він характеризується переміжними рецидивуючими/ремітуючими фазами - з періодами ремісії, які згодом стають коротшими. Його симптоми включають будь-яку комбінацію спастичного парезу, хиткої ходи, диплопії та нетримання сечі.

Категорія спадкових метаболічних порушень включає вісім ідентифікованих лейкодистрофій: метахроматичну лейко дистрофію, хворобу Рефсума, адренолейкодистрофію, хворобу Крабе, фенілкетонурию, хворобу Канавана, хворобу Пеліцеуса-Мерцбахера і хворобу Александра. Перші шість являють собою порушення накопичення. Відсутність або порушення функції ферменту викликає токсичне утворення хімічних речовин. З іншого боку, етіологія хвороби Пеліцеуса-Мерцбахера і хвороби Александра залишається невідомою.

Клінічний перебіг спадкових демієлінізуючих порушень, які звичайно мають тенденцію виявлятися у дитячому або ранньому дитячому віці, трагічний. Раніше здорові діти втрачають, при швидкому прогресуванні, зір, слух, мову і здатність рухатися. Прогноз - смерть протягом декількох років.

2) Демієлінізуючі стани. У даному описі демієлінізуючий стан визначається як стан, який приводить до дефіциту мієлінізації. Подібні демієлінізуючі стани включають, без обмеження, пошкодження спинного мозку, травматичне пошкодження головного мозку і удар.

3) Пошкодження спинного мозку (SCI). У даному описі SCI визначається як пошкодження спинного мозку, яке приводить до втрати функцій, таких як рух або чутливість.

4) Травматичне пошкодження головного мозку (TBI). У даному описі травматичне пошкодження головного мозку визначається як пошкодження, яке приводить до руйнування головного мозку. Травма голови може існувати в одній з двох форм:

- Закрита травма голови спостерігається, коли голова, що рухається, швидко зупиняється, як це буває при ударі об лобове скло автомобіля або при ударі тупим предметом, що приводить до того, що головний мозок ударяється об тверду кісткову поверхню всередині черепа. Закрита травма голови може також спостерігатися за відсутності безпосередньої зовнішньої травми голови, якщо головний мозок зазнає швидкого руху вперед або назад, як це буває при хлистовій травмі.

- Проникаюча травма голови спостерігається, коли предмет, що швидко рухається, такий як куля, пронизує череп.

Як закриті, так і проникаючі травми голови можуть викликати локалізоване і поширене або дифузне пошкодження головного мозку. Одержані інвалідизуючі виявлення можуть включати втрату пам'яті та емоційний неспокій, рухові ускладнення, включаючи параліч, і порушення п'яти почуттів. Крім того, багато пацієнтів від одержаних травм вмирає.

У наш час лікування фокусується на стримуванні поширення пошкодження наскільки це можливо, протягом перших 24 годин після одержання травми. При пошкодженні головного мозку подальші пошкодження поширюються за межі первинного пошкодження. У результаті спостерігається каскад «повторного пошкодження». Власні імунні клітини головного мозку запускають набухання і накопичення рідини, а пошкоджені нервові клітини починають вивільняти нейромедіатор, що назива-

ється глутаматом, який може невдовзі накопичитися до рівнів, які є токсичними для оточуючих нейронів.

5) Реабілітація після удару. У даному винаході реабілітація після удару визначається як втручання, яке приводить до відновлення функцій, втрачених внаслідок удару.

6) Удар. Як визначається у даному винаході, удар має місце, коли кров'яні згустки блокують кровоносну судину або артерію, або коли кровоносна судина розривається, припиняючи приплив крові до ділянки мозку. Коли удар має місце, це приводить до загибелі клітин головного мозку на прилеглій ділянці. Лікарі називають вказану ділянку мертвих клітин інфарктом. Вказані клітини звичайно гинуть протягом періоду часу від декількох хвилин до декількох годин після початку удару. При ударі показники демієлінізації, такі як співвідношення магнітного перенесення (MTR), тісно пов'язані з пошкодженням аксонів, яке корелює з моторним дефіцитом (Pendlebury et al., 2000).

7) Алкіл або алкілен. Якщо не стверджується або не вказано інше, термін «алкіл» або «алкілен» означає алкільну або алкіленову групу з розгалуженим або прямим ланцюгом, придатну для даної формули, яка описується кількістю атомів вуглецю в алкілі, наприклад, C₁-C₆алкіл означає один, два, три, чотири, п'ять або шість атомів вуглецю алкілу або алкілену з розгалуженим або прямим ланцюгом, як це може бути у випадку, або будь-яких його межах, без обмеження, наприклад, C₁-2, C₁-3, C₁-4, C₁-5, C₂-3, C₂-4, C₂-5, C₂-6, C₃-4, C₃-5, C₃-6, C₄-5, C₄-6, C₅-6 і т.п.

8) C₁-C₆алкокси. Якщо не стверджується або не вказано інше, термін C₁-C₆алкокси означає алкоксигрупу з прямим або розгалуженим ланцюгом, що має від 1 до 6 атомів вуглецю. Приклади вказаної групи включають метокси, етокси, н-пропокси, ізопропокси, н-бутокси, ізобутокси, вторбутокси, т-бутокси і пентокси і гексокси з прямим і розгалуженим ланцюгом.

9) Галоген. Якщо не стверджується або не вказано інше, термін галоген означає фтор, хлор, бром або йод.

10) C₁-C₆алканова кислота. Якщо не стверджується або не вказано інше, термін C₁-C₆алканова кислота буде означати карбонову кислоту, в якій карбоксильна група з'єднана з воднем або алкільною групою з 1-5 атомів вуглецю.

11) C₁-C₆алканол. Термін C₁-C₆алканол означає групу, одержану видаленням гідроксильної групи від карбоксильної групи C₁-C₆алканової кислоти, і, таким чином, він включає, наприклад, форміл, ацетил і подібні. Терміни алканол, алканол та алкінол будуть означати групи, одержані видаленням гідроксильної групи від карбоксильної групи алканової кислоти, алкенової кислоти і алкінової кислоти, відповідно. Так, наприклад, лінолейна група, одержана з лінолевої кислоти, являє собою приклад терміну алкенол, як визначено вище.

12) «Фармацевтично прийнятні солі» означає як кислотно-адитивну сіль, так і основно-адитивну сіль, яка є сумісною з лікуванням пацієнтів для призначеного застосування.

13) «Фармацевтично прийнятна кислотна-адитивна сіль» являє собою будь-яку нетоксичну органічну або неорганічну кислотно-адитивну сіль основних сполук, представлених формулою I, або будь-якої з її проміжних сполук. Приклади неорганічних кислот, які утворюють відповідні солі, включають хлористоводневу, бромистоводневу, сірчану і фосфорну кислоти, і кислоти металів, такі як моногідроортофосфат натрію і гідросульфат калію. Приклади органічних кислот, які утворюють відповідні солі, включають моно-, ди- і трикарбонові кислоти. Прикладами вказаних кислот є, наприклад, оцтова, гліколева, молочна, піровиноградна, малінова, бурштинова, глутарова, фумарова, яблучна, винна, лимонна, аскорбінова, малеїнова, гідроксималеїнова, бензойна, гідроксibenзойна, фенілоцтова, корична, саліцилова, 2-феноксibenзойна, п-толуолсульфонова кислота і суфонові кислоти, такі як метансульфонова кислота і 2-гідроксietансульфонова кислота. Можуть утворюватися як моно-, так і ди-кислі солі, і вказані солі можуть існувати у гідратованій, сольватованій або практично безводній формі. Звичайно, кислотно-адитивні солі вказаних сполук є у більшій мірі розчинними у воді і різних гідрофільних органічних розчинниках, і, у порівнянні зі своїми вільноосновними формами, звичайно мають більш високі температури плавлення.

14) «Фармацевтично прийнятні основно-адитивні солі» означає нетоксичні органічні або неорганічні основно-адитивні солі сполук формули I, або будь-якої з її проміжних сполук. Прикладами є гідроксиди лужних металів або лужноземельних металів, такі як гідроксиди натрію, калію, кальцію, магнію або барію; аміак, а аліфатичні, аліциклічні або ароматичні органічні аміни, такі як метиламін, триетиламін і піколін. Критерії відбору відповідних солей повинні бути відомі фахівцям у даній області.

15) «Стереїзомери» являє собою спільний термін для всіх ізомерів індивідуальних молекул, які відрізняються один від одного тільки орієнтацією атомів у просторі. Він включає ізомери дзеркального відбиття (енантіомери), геометричні (цис/транс) ізомери та ізомери сполук, що мають більше одного хірального центру, які не є дзеркальними відбиттями один одного (діастереїзомери).

16) «Пацієнт» означає теплокровна тварина, така як, наприклад, щур, миші, собаки, коти, морські свинки і примати, такі як людина.

17) «Лікувати» або «лікування» означає полегшення симптомів, усунення причини симптомів як на тимчасовій, так і на постійній основі, або запобігання або сповільнення появи симптомів зазначеного розладу або стану.

18) «Терапевтично ефективна кількість» означає кількість сполуки, яка є ефективною для лікування зазначеного розладу, захворювання або стану.

19) «Фармацевтично прийнятний носій» являє собою нетоксичний розчинник, диспергуючий агент, наповнювач, ад'ювант або інший матеріал, що змішують з активним інгредієнтом з метою формування фармацевтичної композиції, тобто лі-

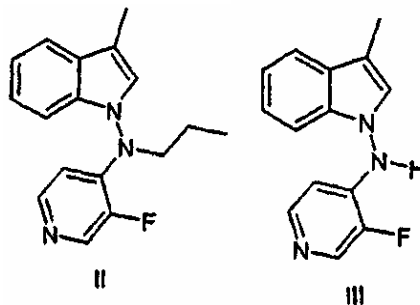
карської форми, яку можна вводити пацієнту. Один приклад вказаного носія являє собою фармацевтично прийнятну олію, яку звичайно використовують для парентерального введення.

20) «Невропатичний біль» означає біль, який викликає пошкодження нервової системи. Пошкодження нервової системи може бути ідентифіковане або не ідентифіковане. Приклади невропатичного болю включають постгерпетичну невралгію, хворобливу діабетичну невропатію, фантомний біль у кінцівках і центральний постінсультний біль.

21) «Подразнення і дисфункція сечового міхура» означає стани, такі як інтерстиціальний цистит і надзвичайно активний сечовий міхур. Надзвичайно активний сечовий міхур являє собою певний медичний стан, який характеризується симптомами, що включають часте сечовипускання, позиви і нетримання сечі, випадкове випускання сечі, яке спостерігається після сильного раптового позиву до сечовипускання. Діагноз надзвичайно активного сечового міхура ставлять при відсутності локальної патологічної або пов'язаної з метаболізмом етіології, з симптомами, властивими мимовільним скороченням сечового міхура, внаслідок надмірної активності м'яза-детрузора. Інтерстиціальний цистит (IC) являє собою хронічний запальний стан стінки сечового міхура, який часто залишається недіагностованим.

Сполуки формули I можуть ефективно поліпшувати швидкість і ступінь відновлення при гострому пошкодженні спинного мозку і довготривалому пошкодженні спинного мозку. Вони володіють властивостями, які полягають у блокаді натрієвих каналів, залежних від використання, і з блокадою потенціалочутливих калієвих каналів *in vivo*. Вони є більш безпечними терапевтичними агентами, ніж 4-AP. Особливо переважними є сполуки, в яких R являє собою водень, галоген, трифторметил або C₁-C₆алкіл; R₁ являє собою водень або C₁-C₆алкіл; R₂ являє собою водень або C₁-C₆алкіл; R₃ являє собою водень, C₁-C₆алкіл або галоген; і р дорівнює 0. Іншими переважними сполуками є ті сполуки, в яких аміногрупа приєднана у 4 положенні піридинової групи.

Ще більш переважними сполуками є сполуки формул II [що також називаються у даному описі HP 184 або N-(3-фтор-4-піридиніл)-N-пропіл-3-метил-1H-індол-1-амін] і III (що також називаються у даному описі "8183").



HP 184 дуже добре переноситься у мікромольних концентраціях у головному мозку через одну годину після в/ч введення 30мг/кг HP 184 щурам (Smith et al., 1996).

Унікальна комбінація блокади натрієвих каналів, залежних від використання, і блокади потенціалочутливих калієвих каналів також відрізняє сполуки за даним винаходом від «чистих» блокаторів натрієвих каналів, таких як карбамазепін і фенітоїн. Дані агенти успішно застосовувалися для покращення «позитивних» симптомів MS (хворобливого тонічного нападу і дизестезії). Однак, вони погіршували негативні симптоми (параліч і гіпестезію) (Sakurai and Kanazawa, 1999). Сполуки за даним винаходом посилюють нейрональну функцію, завдяки тому факту, що вони блокують калієві канали. Це сприяє функціональному відновленню. У наш час вважають, що блокатори натрієвих каналів є корисними для лікування хворобливих симптомів і/або як нейропротективні агенти. Від них, однак, не чекають посилення досягнень в області реабілітації.

При лікуванні пацієнта, який страждає станом або розладом, описаним вище, сполуку формули (I) можна вводити у будь-якій формі або будь-яким способом, які роблять сполуку біодоступною у терапевтично ефективних кількостях, включаючи пероральний, сублінгвальний, трансбуккальний, підшкірний, внутрішньом'язовий, внутрішньовенний, черезшкірний, інтраназальний, ректальний, місцевий способи і подібні. Фахівець в області виготовлення композицій може визначити відповідну форму і спосіб введення, в залежності від конкретних властивостей сполуки, вибраної для стану або захворювання, що потрібно лікувати, стадії захворювання, стану пацієнта та інших обставин, які відносяться до справи. Наприклад, див. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е видання, Mack Publishing Co. (1990), яка включена сюди як посилання.

Сполуки формули I можна вводити у чистому вигляді або у формі фармацевтичної композиції у комбінації з фармацевтично прийнятними носіями, співвідношення і природа яких визначаються розчинністю і хімічними властивостями вибраної сполуки, вибраним шляхом введення, стандартною фармацевтичною практикою та іншими критеріями, що відносяться до справи.

Сполуки за даним винаходом можна вводити перорально, наприклад, у формі таблеток, пастилок, капсул, еліксирів, суспензій, розчинів, сиропів, облаток, жувальних гумок і подібних, і вони можуть містити один або більше наступних допоміжних агентів: зв'язувальні агенти, такі як мікрокристалічна целюлоза, камедь трагакант або желатин; наповнювачі, такі як крохмаль або лактоза; розпушувачі, такі як альгінова кислота, Primogel, кукурудзяний крохмаль і подібні; змащувальні агенти, такі як стеарат магнію або Sterotex; агенти, що забезпечують ковзання, такі як колоїдний діоксид кремнію, і можна додавати підсолоджувачі, такі як сахароза або сахарин, або коригент, такий як м'ята перцева, метилсаліцилат або апельсиновий коригент. У випадку, коли лікарська форма являє собою капсулу, вона може містити, крім матеріалів вказаного вище типу, рідкий носій, такий як поліетиленгліколь або жирну олію. Інші дозовані лікарські форми можуть містити інші матеріали, які змінюють фізичну форму лікарської форми,

наприклад, покриття. Так, таблетки або пілюлі можна покривати цукром, шелаком або іншими ентросолюбільними покриваючими агентами. Сироп може містити, крім сполук за даним винаходом, сахарозу як підсолоджувач і певні консерванти, барвники і коригенти.

Сполуки формули (I) за даним винаходом можна також застосовувати місцево, і у цьому випадку носій може включати розчин, мазь або гелеву основу. Основа, наприклад, може включати одну або більше з наступних речовин: вазелін, ланолін, поліетиленгліколь, бджолиний віск, мінеральне масло, розріджувачі, такі як вода і спирт, та емульгатори і стабілізатори.

Розчини або суспензії можуть також включати одну або більше з наступних допоміжних речовин: стерильні розріджувачі, такі як вода для ін'єкцій, фізіологічний розчин, жирні олії, поліетиленгліколь, гліцерин, пропіленгліколь або інші синтетичні розчинники; антибактеріальні агенти, такі як бензиловий спирт або метилпарабен; антиоксиданти, такі як аскорбінова кислота або бісульфіт натрію; хелуючі агенти, такі як етилендіамінтетраоцтова кислота; буфери, такі як ацетати, цитрати або фосфати, і агенти для коригування тонічності, такі як хлорид натрію або декстроза. Препарат для парентерального введення можна поміщати в ампули, одноразові шприци або флакони, які містять велику кількість доз.

Високоліпофільні складні ефіри, аміді і карбамати за даним винаходом здатні до уповільненого вивільнення в організмі ссавців протягом періоду часу у декілька днів або приблизно від одного до чотирьох тижнів, якщо вони виготовлені і введені у формі препаратів-депо, як, наприклад, при ін'єкції у належним чином вибраній фармацевтично прийнятній олії. Переважними оліями є олії рослинного походження, такі як кунжутна олія, бавовняна олія, кукурудзяна олія, кокосова олія, соєва олія, оливкова олія і подібні, або вони являють собою синтетичний ефір жирних кислот і багатоатомних спиртів, таких як гліцерин або пропіленгліколь.

Композиції-депо за даним винаходом виготовляють розчиненням високоліпофільного складного ефіру, аміді або карбамату за даним винаходом у фармацевтично прийнятній олії у стерильних умовах. Олію вибирають таким чином, щоб одержати вивільнення активного інгредієнта протягом бажаного періоду часу. Відповідну олію фахівець може легко визначити за вже відомими даними або без зайвого експериментування.

Межа доз, в якій сполуки формули I володіють здатністю діяти терапевтично, може варіюватися в залежності від конкретного захворювання або стану, що піддається лікуванню, і його тяжкості, пацієнта, композиції, інших хворобливих станів, від яких страждає пацієнт, та інших лікарських засобів, які можуть одночасно вводитися пацієнту. У загальному випадку сполуки формули I будуть володіти терапевтичною активністю у дозах приблизно від 0,001 мг/кг маси тіла пацієнта на день до 100 мг/кг маси тіла пацієнта на день.

Наступні приклади служать ілюстративним цілям і не призначені жодним чином для обмеження обсягу винаходу.

Приклад 1

Дані *in vivo*, які підтверджують блокаду потенціалочутливих натрієвих каналів

Методи: Експериментальна методика базується на методі Bachauß et al. (1992). Самцям миші CD-1 вагою 35-40г давали наркоз хлоральгідратом (400мг/кг). Під хірургічним мікроскопом проводили 3мм вертикальний розріз шкіри на 2мм позаду правої очної западини. Зміщували скроневи́й м'яз і здійснювали малу трепанацію черепа для оголення твердої мозкової оболонки. Тверду мозкову оболонку розтинали та зміщували і оголювали дистальну частину правої середньої сонної артерії. Артерію закупорювали угору по ходу кровотоку по відношенню до головної біфуркації за допомогою біполярної електрокоагуляції з використанням атравматичного пінцета. Об'єм інфаркту визначали через 24 години за допомогою 2% розчину хлориду трифенілтетразолію. У даній експериментальній парадигмі мишам (по 10 у групі) без періоду голодування перорально вводили HP 184 за одну годину до закупорювання артерії. Зменшення об'єму інфаркту у лікованих мишей оцінювали у порівнянні з 1% оцтовою кислотою, носієм. Результати представлені у таблиці 1.

Таблиця 1

Неврологічна активність HP 184 на експериментальній моделі удару у мишей рМCAO

Доза (мг/кг, п/о)	Час (хв.)	% зменшення об'єму інфаркту середнє± СКО середнього
1	-60	21±3
10	-60	32±11*
10	-60	40±2,5**

*=p<0,05; **=p<0,01

Неврологічний захист, який спостерігався на моделі постійної оклюзії сонної артерії у мишей (рМCAO), узгоджується з *in vivo* блокадою потенціалочутливих натрієвих каналів при даній дозі та часі.

Приклад 2

Вплив HP 184 на набряк після фототромботичного церебрального пошкодження у щурів

Обґрунтування/Мета: Тромбоемболічний удар являє собою третю за частотою причину смерті у країнах Заходу. Його викликає кров'яний згусток або тромб, який руйнується, як такий, що утворився всередині церебрального кровотоку, так і такий, що утворився у серці або великих судинах і перенесений у церебральний кровотік. Кровотік потім переривається і розвивається ішемічне пошкодження, з набряком, некрозом і апоптозом тканини. Набряк являє собою пошкоджуючий фактор, оскільки він здавлює головний мозок, сприяючи ішемії, а також лізису клітин і механічному пошкодженню. Лікування з використанням HP 184, блокує одночасно Na⁺ і K⁺ каналів, вивчали для

оцінки його впливу на вказаний церебральний набряк.

Метод: Самцям щура Sprague Dawley (вага 180-200г) давали наркоз хлоральгідратом (400мг/кг в/ч) і поміщали у стереотаксичний апарат. Розтинали шкіру для оголення черепа і приводили холодне світло (Bioblock 150W) у контакт з правою стороною черепа у напрямі вперед від ламбди. Внутрішньовенно вводили барвник бенгальський рожевий (10мг/кг в/в у фізіологічному розчині) і зразу починали освітлення черепа, яке продовжували протягом 5 хвилин. На шкіру потім накладали шви, закриваючи череп, і тварину повертали у клітку. Через двадцять чотири години після нанесення фототромботичного пошкодження тварини одержували HP 184 в 1% розчині Tween у воді внутрішньовенним шляхом, дозою 0, 10 або 20мг/кг маси тіла, в об'ємі 5мл/кг. Через годину тварин умертвляли шляхом декапітації і видаляли головний мозок (дивись додаток до протоколу). З місця пошкодження і з ділянки, протилежної пошкодженню, відбирали серцевинні зразки за допомогою порожнистого бору діаметром 6мм. Вміст води визначали за співвідношенням маса сирої тканини/маса сухої тканини, і набряк виражали у % надлишку води у пошкодженному зразку у порівнянні з контрольним зразком, взятим з протилежної пошкодженню півкулі, для кожного щура. Результати представлені у таблиці 2.

Таблиця 2

Лікування через 24год. після пошкодження	n	Набряк (% надлишку води) через 25год. після пошкодження
Носій	26	4,10±0,12
HP 184 дозою 10мг/кг в/в	12	3,61±0,23 ns
HP 184 дозою 20мг/кг в/в	13	3,20 ±0,27**

Статистика: ANOVA плюс Tukey-Kramer
**=p<0,001

HP 184 продемонстрував значне (22%) зменшення набряку у правій частині кори головного мозку через одну годину після в/в введення дозою 20мг/кг і через 25 годин після фототромботичного пошкодження.

Приклад 3

Вплив HP 184 на розміри пошкодження і неврологічну функцію після скороминучої осередкової ішемії головного мозку у щурів

Обґрунтування/Мета: У даному дослідженні HP 184 вводили через 1 годину після початку ішемії щурам з моделлю скороминучої осередкової ішемії головного мозку. Вимірюваними параметрами були розміри пошкодження і неврологічна функція.

Методи: Самцям щура Sprague Dawley [Iffa Credo, Франція] вагою близько 220-240г давали наркоз галотаном (1,4%) у суміші закис азоту-кисень (70:30). Виділяли обидві спільні сонні арте-

рії (ССА). Ліву середню церебральну артерію (МСА), оголену за допомогою скроневої трепанації черепа, затискали мікрозатискачем, і одночасно перекривали ССА на 1 годину. Температуру тіла і головного мозку підтримували у межах норми. Після оперативного втручання тварин повертали в їх клітки у приміщення з температурою 24-26°C.

НР 184, розчинений у 1% розчині Tween (у стерильній воді для ін'єкцій), вводили дозою 10 і

20мг/кг в/в через 1 годину після початку ішемії, а контрольні щури одержували носій, відповідно до вказаного протоколу. Через 24 години після ішемії сліпим способом вивчали неврологічну функцію, використовуючи 9-бальну шкалу.

Бальна шкала для визначення неврологічної функції

Назва		Нормальний бал	Дефіцит
Реакція опори			
Підвішування за кінцівку	ліва передня лапа	1	0
	ліва	1	0
Візуально		1	0
Хапальний рефлекс	ліва передня лапа	1	0
	ліва	1	0
Встановлювальний рефлекс			
Голова нахилена	ліва сторона	1	0
	права	1	0
Патологічні пози		Немає	Є
вигин грудної клітки		1	0
згинання лівої передньої кінцівки		1	0
Загальний неврологічний бал		9	

Після цього щурів умертвляли і видаляли головний мозок. Свіжі зрізи одержували за допомогою матриці для головного мозку і забарвлювали 2% хлоридом трифенілтетразолію при 37°C протягом 5хв. Зрізи потім зберігали у 10% формаліні при 4°C протягом 24год. Площу інфаркту вимірювали за допомогою аналізатора зображення (Leica Q500).

Результати: Ішемія індукувала розвиток церебральних пошкоджень як у корі, так і у смугастому тілі головного мозку (див. Фіг.1, яка ілюструє вплив НР 184 на пошкодження головного мозку дозою 10 і 20мг/кг в/в болюсно, через 1 годину після оклюзії МСА). НР 184 дозою 10мг/кг в/в значно зменшував пошкодження головного мозку на 41% ($p<0,05$). Вказане зменшення було значним у корі головного мозку (-45%, $p<0,05$).

Приклад 4

Вимірювання блокади калієвих каналів

Методи: Клітини PC12 (ATCC, Rockville, MD) вирощували на модифікованому за способом Ігла середовищі Дульбеко з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки (GIBCO BRL Grand Island, NY). Потік у калієвих каналах вимірювали з використанням стандартних електрофізіологічних протоколів фіксації потенціалу, як описано раніше (Rampe et al., 1998).

Результати і обговорення: Потік у калієвих каналах збуджували за допомогою 200мсек кламп-імпульсів до +40мВ від потенціалу утримання -80мВ. У результаті вказаної схеми одержували підтримуваний направлений зовні потік. Застосування НР 184 (10мкМ) зменшувало амплітуду вказаного потоку і збільшувало швидкість його зникнення. У випадку, коли потік вимірювали у кінці імпульсу, НР 184 зменшував амплітуду потоку на 75±4% (n=4). Дані результати узгоджуються з думкою, що НР 184 діє як антагоніст потенціалочутливих K^+ каналів шляхом блокування активованого стану.

Приклад 5

In vivo дані, які підтверджують посилення м'язової функції

Обґрунтування: Неорганічний барвник рутеній червоний (RuR), як повідомляється, блокує потенціалочутливий потік Ca^{+2} у клітинах різних типів, включаючи чутливі нейрони миші (Duchen, 1992), синаптосомах і нейром'язових препаратах (Hamilton and Lundy, 1995; Tapia and Velasco, 1997). Крім того, RuR блокує вивільнення нейромедіаторів у синаптосомах головного мозку (Meza-Ruiz and Tapia, 1978; Tapia and Meza-Ruiz, 1977) і нейром'язовому синапсі (Alnaes and Rahamimoff, 1975; Person and Kuhn, 1979). In vivo внутрішньочеревинне (в/ч) введення RuR викликає периферичний параліч у мишей (Tapia et al., 1976), і даному ефекту протидіє 4-амінопіридин (4-AP), блокатор потенціалочутливих K^+ каналів (Tapia, 1982). Tapia і Velasco (1997) проаналізували ефекти RuR in vivo та in vitro і припустили, що RuR взаємодіє з сайтами Ca^{+2} , розташованими на мембрані нервового закінчення. Дослідження зв'язування показали, що RuR селективно блокує Ca^{+2} канали N-типу, і вказані канали регулюють приплив Ca^{+2} , необхідний для вивільнення нейромедіатора. Вказані автори також припустили, що в/ч введення RuR може являти собою експериментальну модель синдрому міастенії гравіс Ітона-Ламберта, автоімунного захворювання, яке характеризується блокадою входу Ca і вивільнення ACh, завдяки антитілам, які зв'язуються з Ca^{+2} каналами N-типу. Є повідомлення, яке узгоджується з вказаною можливістю, про те, що 4-AP поліпшує м'язову слабкість і відновлює нейром'язову передачу у пацієнтів (Lundh et al., 1977a; 1977b; 1979; McEvoy et al., 1989; Aisen et al., 1995).

Здатність 4-амінопіридину (4-AP) і гуанідину протидіяти індукованому RuR периферичному паралічу виявляється, можливо, завдяки їх здатності полегшувати вивільнення нейромедіаторів (Lundh,

1978; Lundh and Thesleff, 1977; Tapia and Stiges, 1982). У будь-якому випадку, Tapia і співавтори (Tapia and Stiges, 1982) повідомили, що RuR блокує вивільнення, індуковане 4-AP, у синапсосомах.

In vitro HP 184 посилює вивільнення нейромедіаторів за допомогою механізму, який відрізняється від механізму дії 4-AP. У високих концентраціях 4-AP посилює як стимульоване електрикою, так і спонтанне вивільнення, але вказані ефекти є залежними від кальцію. Навпаки, HP 184 посилює тільки не залежне від кальцію спонтанне вивільнення нейромедіаторів (Smith et al., 1993). Було висловлене також припущення про те, що спонтанне вивільнення грає функціональну роль in vivo (Smith et al., 1996).

Метою наступного експерименту було визначення, чи можуть HP 184 і 4-AP протидіяти паралізуючому ефекту RuR після одночасної ін'єкції.

Метод і результати: Групам по 4-5 мишей (CD-1; Charles River; 25-35 грамів) окремо, але одночасно ін'єкували в/ч рутенієвий червоний і носій (1% крижану оцтову кислоту), рутенієвий червоний і 4-AP або рутенієвий червоний і HP 184. У даному експерименті випробовували також сполуку, відому як «8183». Починаючи через 15 хвилин після ін'єкцій, мишей поміщали біля апарату «флагшток» і відмічали їх здатність підтримувати вагу власного тіла (тобто, триматися за флагшток і не падати). Результати фіксували як кількість мишей, які могли підтримувати вагу власного тіла, у порівнянні із загальною кількістю мишей у випробуванні. Дані результати представлені у таблиці 3. Всі експерименти виконували у період часу між 14 год. і 16 год. 30хв.

Таблиця 3

ліки, доза	ліки, доза	15хв.	30хв.	45хв.
RuR, 30мг/кг в/ч	носій	29 з 69 (42%)	19 з 69 (27,5%)	18 з 64 (30,4%)
	0,3мг/кг 4-AP	22 з 25 (88%)	13 з 25 (52%)	12 з 25 (48%)
	0,6мг/кг 4-AP	12 з 14 (85,7%)	8 з 14 (57,1%)	8 з 14 (57,1%)
	30мг/кг HP 184	15 з 15 (100%)	15 з 15 (100%)	15 з 15 (100%)
	10мг/кг HP 184	14 з 15 (93,3%)	12 з 15 (80%)	11 з 15 (73,3%)
	30мг/кг 8183	13 з 14 (92,8%)	13 з 14 (92,8%)	14 з 14 (100%)
	100мг/кг DPH	11 з 20 (55%)	10 з 20 (50%)	10 з 20 (50%)
	30мг/кг DPH	4 з 15 (26,7%)	3 з 15 (20%)	4 з 15 (26,7%)
	10мг/кг RIL	9 з 15 (60%)	4 з 15 (26,7%)	4 з 15 (26,7%)

Висновок: Як 4-AP (в/ч), так і HP 184 (в/ч) можуть протидіяти периферичному паралічу, індукованому в/ч введенням RuR. Це означає, що HP 184 здатний посилювати нейрональну передачу in vivo, можливо, за допомогою блокади K^+ каналів. Можливо також, як у випадку 4-AP, що HP 184 посилює нейрональну передачу, оскільки експерименти зі зрізами головного мозку in vitro підтвердили підвищене вивільнення нейромедіаторів у головному мозку (Smith et al., 1993; 1996).

Дози блокатів натрієвих каналів дифенілпідантоїну (DPH) і рилузолу (RIL), вивчені у даному експерименті, раніше були показані як нейропротективні на моделях осередкової ішемії (Rataud et al., 1994; O'Neill et al., 1997). Відсутність їх ефекту на описаній моделі підтверджує інтерпретацію, що здатність HP 184 протидіяти периферичному паралічу, індукованому RuR, можливо, не обумовлена блокадою натрієвих каналів in vivo. Це також підтверджують клінічні дані. Негативні симптоми MS (втрата руху) часто погіршуються блокаторами натрієвих каналів (Sakurai and Kanazawa, 1999).

Приклад 6

Моделі захворювань, що пошкоджують спинний мозок

Обґрунтування і мета: Gruner і Yee (1999) показали, що через 25 днів після пошкодження спинного мозку, 4-AP посилює mMEP після пошкодження спинного мозку різного ступеня у щурів. Функціональні поведінкові зміни вимірювали за допомогою ідентичних процедур. Вказані виявлення, як було показано, корелювали з мінімальним mMEP. Мета даних експериментів була двоякою:

1) визначити, чи може HP 184 ослабити моторні порушення помірної інтенсивності, індуковані пошкодженням спинного мозку, при негайному введенні, і порівняти його ефективність з ефективністю метилпреднізолону сукцинату (MPSS),

і

2) визначити, чи може HP 184 поліпшувати моторну функцію у щурів з довготривалим (25 днів) пошкодженням спинного мозку малої інтенсивності, і порівняти його ефективність з ефективністю 4-амінопіридину (4-AP).

Негайне лікування - в/ч введення

Спинний мозок самок щурів піддавали ламінектомії (контроль, n=12) або здавлювали до діаметра 1,4мм (5 груп, n=12 у кожній). Нормальний діаметр спинного мозку складає приблизно 2,5мм. Дана компресія являє собою помірне пошкодження, яке характеризується первинними балами по ходьбі на відкритому просторі 1,5-2,5 по шкалі ходьби на відкритому просторі. Визначення шкали ходьби на відкритому просторі (OFT) наступні:

0,0 Відсутність спонтанного руху

0,7 Слабкі рухи

1,0 Рух у стегновому і/або у колінному суглобі (не у гомілковостопному суглобі)

1,3 Активний рух у стегновому і у колінному суглобі, не у гомілковостопному суглобі

1,7 Сумнівний рух у гомілковостопному суглобі

2,0 Рух кінцівки у всіх трьох великих суглобах

2,3 Спроби опори

2,7 Опора тільки в окремих випадках

3,0 Активна опора, некоординована хода

3,3 Переміжні епізоди координованої ходи

3,7 Відсутність контролю гомілковостопного суглоба і стопи, ходить на суглобах пальців або на медіальній поверхні стопи

4,0 Координація передніх кінцівок і задніх кінцівок при ходьбі

4,3 Поліпшена постуральна опора на задні кінцівки, живіт не низько над землею

4,7 Один або два пальці стопи волочаться, легка нестійкість при повороті на повній швидкості

5,0 Нормальна хода і основа опори, немає втрати рівноваги при швидких поворотах, немає волочіння пальців стопи

Медикаментозне лікування

Через 15 хвилин після пошкодження (день 1) щури у групах НР 184 одержували даний агент у вигляді в/ч ін'єкції 20, 10, 5 або 0 мг/кг у носії - 1% крижаній оцтової кислоти. Введення повторювали на день 2 і 3. З іншого боку, MPSS вводили дозою 30 мг/кг в/ч через 15 хвилин, 2 години, 4 години і 6 годин після пошкодження у день 1. Дана схема введення MPSS була описана як оптимальна у літературі, і паралельна схема введення була використана для людини. У наш час MPSS являє собою єдиний дозволений вид медикаментозного лікування для людей з пошкодженням спинного мозку. Фіг.2 показує поведінкові бали (OFT) у різних групах лікування з перебігом часу. Нормальний бал до оперативного втручання складає 5. Швидкість і ступінь поліпшення істотно відрізнялися від тих же показників у щурів, які одержували носій, у групах, що одержували дозу як 20, так і 5 мг/кг. Кожна величина являє собою середнє плус СКО середнього для 8-12 щурів.

Негайне лікування - введення п/о

Спинний мозок самок щурів піддавали ламінектомії або здавлювали до діаметра 1,4 мм. У групах НР 184 щурам перорально вводили лікарський засіб за 5-10 хвилин до пошкодження, а потім - один раз на день на день 2 і 3. MPSS давали, як описано раніше. Поведінкові бали (OFT) показані на Фіг.3. Нормальний бал до оперативного втручання складає 5.

Швидкість і ступінь поліпшення поліпшувалися при всіх дозах, включаючи групу, яка одержувала 10 мг/кг, у порівнянні з групою, що одержувала носій. Кожна величина являє собою середнє плус СКО середнього для 12 щурів.

Експеримент з хронічним пошкодженням

Спинний мозок самок щурів піддавали ламінектомії або здавлювали до діаметра 1,6 мм. Це являло собою незначне пошкодження, і було зроблено для одержання балів OFT 4,0 через 25 днів, протягом яких лікування не проводилося. Дана схема була вибрана у спробі відтворити той же ступінь моторних порушень, який описаний у Gruner і Yee (1999), що показали поліпшення, викликані 4-AP, величин мініатюрного потенціалу кінцевої пластинки задньої кінцівки. Дана процедура, а також тривалість пошкодження, протягом якого лікування не проводилося, також, як було показано, приводить до демієлінізації. Поведінкові бали (OFT) представлені на Фіг.4. Фіг.4 показує середні величини і стандартні помилки у групах, з використанням визначень для шкали ходьби на відкритому просторі, описаної вище у даному опісі.

У даному експерименті бали OFT були трохи вищі (4,3-4,5), що залишало лише маленьке вікно для поліпшення. Використовуючи кожного щура як його власний контроль, стійке поліпшення спостерігали після перорального введення один раз на день НР 184 на день 26, 27 і 28. Стійке поліпшення також спостерігалось після в/ч введення один раз на день 4-AP дозою 0,6 мг/кг. Статистичні відмінності базувалися на змінах для кожного окремого щура (кожний щур служив своїм власним контролем), з використанням U-критерію Мана-Уггаї. Всі поведінкові тести проводили на день 1, день 2 і день 3 через 3 години після введення ліків через зонд. На день 3 лікарські засоби не вводилися (першим днем введення лікарських засобів був день 0). Статистичний аналіз був наступним:

20 мг/кг - значне поліпшення від 3-ї год. до дня 3 ($p=0,002$) у порівнянні з контролем, носій

10 мг/кг - значне поліпшення від 30 хв. і 3 год. до 12 год. ($p=0,014$) у порівнянні з контролем, носій

3 мг/кг - значне поліпшення від 30 хв. і 6 год. до дня 1 ($p=0,0027$) у порівнянні з контролем, носій

4-AP - значне поліпшення від 90 хв. до 3 год. і від 12 год. до дня 2 ($p=0,0027$) у порівнянні з контролем, носій

Таблиця 4 ілюструє зміни суми балів для кожної групи від часу до одержання дози до 3 годин після третьої щоденної дози підряд.

Таблиця 4

	Носій здавлювання	4-AP здавлювання	20 НР здавлювання	10 НР здавлювання	3 НР здавлювання	Ламінект. без здавлювання
До введення дози	4,52±0,04	4,43±0,03	4,54±0,02	4,36±0,01	4,32±0,02	4,87±0,01
Через 3 години після останньої дози	4,53±0,03	4,53±0,02	4,60±0,02	4,44±0,03	4,47±0,04	4,87±0,01

Фіг.5 показує зміни у сумі балів, нормалізованої для кожного щура. Графік показує зміну, яка спостерігалася через три дні введення підряд (від часу до введення доз до 3 годин після трьох щоденних введень підряд), дози величиною 0,6 мг/кг 4-AP (в/ч), 20 або 10 або 3 мг/кг (п/о). Ламінектомія відноситься до контрольної групи. Середня величина \pm СКО середнього для кожної групи ($n=12$) показана на Фіг.5.

Ефективність при довготривалому пошкодженні спинного мозку

Через тридцять п'ять днів після пошкодження спинного мозку помірного ступеню пероральне введення 3 мг/кг НР 184 (п/о) поліпшує моторне відновлення після одноразової дози, а щоденне введення протягом 4 і більше днів приводить до тривалого і стійкого поліпшення, на основі визначень по шкалі ходьби на відкритому просторі,

представленої вище у даному описі. 4-AP дозою 0,6мг/кг (в/ч) мав аналогічну ефективність. Таблична обробка результатів обох досліджень хронічних пошкоджень спинного мозку (лікарські засоби

перший раз вводили через 25 днів після легкого здавлювання спинного мозку і через 35 днів після помірного здавлювання спинного мозку) представлена у таблиці 5.

Таблиця 5

Лікування	День 25 (слабке) до	День 28 (слабке) через 3год. після останньої дози	Дельта	% можливого поліпшення (вищий бал=5)
Контроль	4,52±0,037	4,53±0,026	0,01	2%
4-AP (0,6мг/кг, в/ч)	4,43±0,030	4,53±0,023	0,10	17,5%*
НР 184 (3мг/кг, п/о)	4,32±0,016	4,47±0,035	0,15	22,0%*
Лікування	День 35 (помірне) до	День 39 (помірне) через 3год. після останньої дози	Дельта	% можливого поліпшення
Контроль	4,00±0,074	3,99±0,057	-0,1	-2%
4-AP (0,6мг/кг, в/ч)	3,95±0,084	4,17±0,047	0,22	22,1%*
НР 184 (3мг/кг, п/о)	3,89±0,054	4,17±0,058	0,274	24,8%*

Як показано вище, НР 184 дозою 3мг/кг на день, перорально через шлунковий зонд, через 35-41 день після помірного пошкодження здавлюванням викликав значне поліпшення. У даному дослідженні зазначено, що в області пошкодження у пошкодженному спинному мозку щурів, які одержували НР 184, було більше мієліну. Ці дані свідчать на користь твердження, що НР 184 або посилює процес ремієлінізації, або зменшує процес демієлінізації, що вже відбувається.

Були також проведені дослідження для визначення найменшої ефективної дози НР 184 для помірного хронічного (35 днів після пошкодження) здавлювання, з подвійним сліпим плацебо і позитивним контролем. Ефекти НР 184, які раніше спостерігалися при використанні дози 3мг/кг, п/о, були підтверджені при використанні 4-AP (0,6мг/кг, в/ч) як позитивного контролю. Крім того, вплив всіх видів лікування на забарвлювання мієліну вивчали гістологічно.

1. Оцінка поведінки

Сто п'ятдесят дорослих самок щурів Wistar, вагою 250-300г, одержаних від Charles River, поміщали у віварій Central Animal Facilities (CAF) McMaster University Health Sciences Centre (HSC) щонайменше на один тиждень. Протягом вказаного періоду часу їх піддавали постановочним тестам, описаним нижче, щоб гарантувати, що вони були знайомі з ними. Щурів щодня тренували протягом 2 тижнів до оперативного втручання.

Щурам давали наркоз сумішшю ізофлюран (3-5%):O₂ (1л/хв.) у належним чином обладнаному оперблоці в CAF. Перед оперативним втручанням для полегшення болю вводили темгезик (0,03мг/кг маси тіла, підшкірно (п/к)). Спинний мозок здавлювали (піддавали компресії) модифікованим затиском coverslip шириною 3,5мм (Blight 1991, методика, модифікована у лабораторії Rathbone). Затискач закривали до 1,4мм протягом 15сек., що викликало рівень пошкодження, еквівалентний результату середнього рівня (помірного) по шкалі Gruner (1996). Компресію пошкодження здійснювали іншим способом, за методикою, описаною Blight (1991).

За тваринами спостерігали, щоб встановити больову поведінку, наявність інфекції сечовивід-

них шляхів або затримки сечі. Біль лікували препаратом Tylenol (0,8мг/кг маси тіла, перорально).

Для профілактики інфекції сечовивідних шляхів тваринам перорально вводили препарат Septra (триметоприн-сульфаметоксазол) (4,5мл в 300мл води) протягом періоду часу від 1 дня до втручання і до 5 днів після втручання, і лікували видавлюванням сечового міхура вручну. У випадку інфекції, тобто будь-якої інфекції сечовивідних шляхів, що виявлялася помутнінням або домішкою крові у сечі, підшкірно (п/ш) ін'єкували препарат Baytril (енрофлоксацин, 7мг/кг м.т.) двічі на день.

Зміни опорно-рухової поведінки і сегментних рефлексів оцінювали аж до 5 тижнів після пошкодження. Тварин тестували у ходьбі на відкритому просторі, положенні задньої кінцівки та орієнтації стопи. Тварин оцінювали на дні 2, 7, 14, 21, 28 і 35 після оперативного втручання. До 35 дня після оперативного втручання майже не спостерігалось подальших випадків спонтанного одужання. Таким чином, лікування починали на день 35.

НР 184 розчиняли у стерилізованій (автоклавованій) деіонізованій зворотним осмосом воді, підкисленій крижаною оцтовою кислотою (0,1мл кислоти на 10мл води). 4-AP (Sigma, молекулярна маса 94,12; Jankowska E. et al., 1982; Gruner et al., 1999) розчиняли у фізіологічному розчині (0,6мг/кг м.т.) і вводили шляхом в/ч ін'єкції. Одна група щурів (контроль-1, носій) одержувала через шлунковий зонд носій. Поведінкове тестування здійснювали безпосередньо перед встановленням шлункового зонда і через 3 години після цього. Потім щурів на день 35 умертвляли. Всі інші щури одержували або НР 184 через шлунковий зонд (0,3, 1 або 3мг/кг м.т., залежно від групи) або 4-AP (0,6мг/кг, в/ч) або носій (контроль-2, носій) один раз на день з 35 по 42 дні після оперативного втручання. У вказані дні поведінкові тести здійснювали безпосередньо перед встановленням шлункового зонда і через 3 і 24 години після цього. Потім щурам проводили перфузію на день 43 після проведення останнього поведінкового тесту.

У дні з 35 по 43 після оперативного втручання здійснювали відеозапис поведінкового тесту за допомогою Hi-8.

Статистичний аналіз виконували на комп'ютері Макінтош з використанням програми GB-Stat ppc

6.5.2. Поведінкові бали аналізували за допомогою дисперсійного непараметричного аналізу (ANOVA) Крускал-Уеліса. Post hoc порівняння виконували за допомогою U-критеріїв Мана-Уїтні.

Видиме відновлення опорно-рухової здатності на відкритому просторі оцінювали по середніх балах OFT для кожної групи; результати представлені на фігурах 6а і 6б. Дані результати показують, що здатність тварин, лікованих HP 184 або 4-AP, виконувати тести достовірно відрізнялася від вказаної здатності у контрольних тварин, що одержували носій. ANOVA для повторних вимірювань показав ефект лікування ($p < 0,01$) на дні 35-42.

Результати показують, що як 4-AP, так і HP 184 здійснюють сприятливу дію, поліпшуючи результати поведінкового тестування після помірної хронічної компресії спинного мозку. Незважаючи на те, що всі три концентрації HP 184 здійснювали сприятливу дію, HP дозою 3мг/кг викликав найкраще відновлення опорно-рухової функції, підтверджуючи, таким чином, ефекти HP 184, які спостерігалися при цій дозі раніше. Вказані результати також показують, що найнижча (0,3мг/кг) концентрація HP 184 може не бути найнижчою ефективною дозою HP 184 у даному прикладі.

Гістологічне дослідження спинного мозку

Дослідження для вивчення, чи впливає лікування HP 184 на кількість мієліну у щурів з помірним довготривалим компресійним пошкодженням спинного мозку, при введенні після тривалого періоду часу після пошкодження спинного мозку.

Для оцінки у даному дослідженні використовували спинний мозок щурів, описаних вище.

На день 21 після оперативного втручання експериментальним тваринам давали глибокий наркоз пентобарбіталом натрію (50-60мг/кг маси тіла, в/ч) і здійснювали транскардіальну перфузію спочатку 100мл фізіологічного розчину з 0,05M фосфатним буфером (PBS), що містить 0,1% гепарин, а потім, 300-500мл 4% параформальдегіду (PFA). Діставали сегменти з T9 по L1 спинного мозку, які потім піддавали криозахисту у 30% розчині сахарози і заморожували при -70°C у 10,24% полівініловому спирті і 4,26% поліетиленгліколі.

Сегмент кожного спинного мозку, який включає ділянку пошкодження плюс 10мм краніально і каудально від ділянки пошкодження заливали середовищем Tissue Tek. Здійснювали серію позовжних зрізів з інтервалами 20 мкм на криостаті. Кожний третій зріз забарвлювали люксом швидким блакитним для мієліну. Оцінку здійснювали спостерігачі, не поінформовані про оброблені зразки, на кодованих зрізах. Зрізи досліджували під світловим мікроскопом на предмет ступеня демієлінізації (площі, незабарвленої люксом швидким блакитним).

Для визначення максимальної демієлінізованої площі у спинному мозку цілий зріз дискретизували на фотографії за допомогою мікроскопа Цейса. Ступінь демієлінізації у центрі пошкодження вимірював дослідник, не поінформований про групу лікування, використовуючи програму візуально-го аналізу Bioquant BQ-TCW98.

Статистичний аналіз виконували на комп'ютері Макінтош з використанням програми GB-Stat ppc 6.5.2. Гістологічні результати аналізували за допомогою дисперсійного непараметричного аналізу (ANOVA) Крускал-Уеліса. Post hoc порівняння виконували за допомогою U-критеріїв Мана-Уїтні.

Ступінь демієлінізації для шести експериментальних груп (0,3, 1 або 3мг/кг м.т., залежно від групи, або 4-AP 0,6мг/кг або контроль 1 і 2, носій) показаний на Фіг.7. Стопчикки являють собою кількість мінімальних елементів демієлінізованої площі у центрі здавлювання. ($**P < 0,001$, $*P < 0,05$, дисперсійний непараметричний аналіз (ANOVA) Крускал-Уеліса). Кількісні результати показують, що спинний мозок у тварин, лікованих HP 184 або 4-AP, мав значно більшу мієлінізовану площу, ніж у контрольних тварин, які одержували фізіологічний розчин. Тобто, спинний мозок тварин, які одержували ін'єкції носія, мав значно більшу демієлінізовану площу, ніж у тварин, лікованих HP 184 або 4-AP.

Гістологічний аналіз показав, що як HP 184 (при всіх трьох концентраціях), так і 4-AP здійснювали сприятливу дію на мієлінізацію, що корелювалося з результатами поведінкових тестів. З вказаних груп, тварини, ліковані HP дозою 3мг/кг, показали найменшу демієлінізацію. Таким чином, представляється, що 4-AP або HP 184 здатні посилювати ремієлінізацію на стадії, що настала через тривалий період часу після пошкодження спинного мозку. Малоймовірно, що вказані дані просто являють собою зниження швидкості втрати мієліну, оскільки не спостерігалось різниці у ступені демієлінізації у двох контрольних групах, контролі 1 і контролі 2, оціненому на початку та у кінці експерименту.

Приклад 7

Вплив внутрішньовенного введення HP 184 на подразнення сечового міхура у щурів

Даний експеримент показує ефект внутрішньовенного введення HP 184 на моделі KCl, виділеній Fraser et al. (2001). Fraser et al. комбінували вплив протамінсульфату, який, як вважають, порушує бар'єрну функцію ендотеліальних клітин сечовивідних шляхів, і фізіологічних концентрацій KCl у сечі (500mM). Ефекти внутрішньовенного введення HP 184 порівнювали з ефектами носія як такого ($n=4$ на групу) у дослідженні кумулятивна доза-відповідь на щурах з гострим подразненням сечового міхура, з анестезією уретаном. Безперервна відкрита цистометрія, яка вимірює наповнення і випорожнення сечового міхура під час безперервної інфузії, використовувалася для визначення впливу лікарського засобу на подразнення сечового міхура. Коли сечовий міхур подразнений, він скорочується частіше при одній і тій же швидкості наповнення, через сенсibiliзацію аферентних нервів C-волокон. Фіг.8 ілюструє дозозалежне зменшення частоти скорочень сечового міхура від величин подразнення до введення, у порівнянні з ефектами при введенні носія як такого. Дисперсійний аналіз повторних вимірювань показує, що у той час як носій як такий не здійснював дії, HP 184 значно зменшував частоту скоро-

чень сечового міхура дозозалежним чином ($P=0,0019$).

Приклад 8

Вплив HP 184 на продукування NO у мишей

Мишам ін'єкували 30мг/кг HP 184 (в/ч) за 30 хвилин до LPS (3мг/кг, в/ч). Мишей умертвляли через 5 годин після ін'єкції LPS і збирали плазму крові. Рівні нітрату визначали за допомогою аналізу Griess. Групи були складені з 9-10 мишей кожна. Як показано графічно на Фіг.9, HP 184 інгібує продукування NO. Після одностороннього ANOVA виявилось, що тільки вплив LPS достовірно відрізнявся ($p<0,01$) від впливу носія.

Приклад 9

Оцінка HP 184 на моделі невропатичного болю

Дорослим самцям щурів Sprague-Dawley здійснювали одностороннє здавлювання нерва L6 для одержання хронічного пошкодження нерва. Після одужання від оперативного втручання (через 3-7 днів після оперативного втручання) тварин тестували для оцінки порогу відсмикування лапи у відповідь на механічне подразнення ураженої лапи. Це встановлювали шляхом нанесення уколів каліброваними монофіламентами von Frey у плантарну поверхню кожної задньої лапи. У дослідження включали тільки тварин із 50% зниженням порогу відсмикування у лігваній лапі, і їх сліпим способом розділяли на 6 груп: три групи, що одержували одну з трьох доз HP 184 (0,3, 3 і 20мг/кг, п/о), четверту групу, що одержувала одноразову дозу іншої сполуки, яка називається MDL (10мг/кг, в/ч), п'яту групу, що одержувала габапентин (90мг/кг, п/к) і шосту групу, що одержувала тільки носій. Поведінкові тести проводили через 45 хвилин після введення габапентину (90мг/кг, п/к) і через 3 години після введення HP 184, MDL і носія. Для кожної тварини підраховували різницю у балах по порозу відсмикування лігваної і нелігваної лапи, і дану різницю обробляли ANOVA, з використанням групи як головного фактора. Результати показані на Фіг.10. Графік показує середню (\pm СКО) різницю між порогами відсмикування лівої (лігваної) і правої (нормальної) лапи, до і після першого введення лікарського засобу (гостра фаза дослідження). Статистичний аналіз виявив дозозалежне ослаблення механічної гіпералгезії, викликаній лігуванням L5, при введенні HP 184 дозою 20мг/кг, і виразний зворотний розвиток гіпералгезії після введення габапентину дозою 90мг/кг. Аналіз проводився між/всередині повторних вимірювань ANOVA. Далі слідувало post hoc порівняння (LSD) в умовах тимчасової взаємодії на групі X, для вивчення величин порогу відсмикування до введення лікарського засобу у порівнянні з вказаними величинами після введення лікарського засобу.

Група: $F(5,43)=8,18$, $p<0,001$

Час: $F(1,43)=47,34$, $p<0,001$

Час X групи: $F(5,43)=9,25$, $p<0,001$

У тварин, які одержували носій, спостерігалася велика різниця порозів відсмикування при механічному подразненні між двома лапами.

Список літератури:

Agoston S, Bowman WC, Houwertjes MC, Rodger IW, Savage AT. Direct action of 4-aminopyridine on the contractility of a fast-contracting

muscle in the cat. Clin Exp Pharm Physiol 1982; 9: 21-34.

Aisen ML, Sevilla D, Gibson G, Kutt H, Blau A, Edelstein L, Hatch J and Blass J (1995) 3,4-Diaminopyridine as a treatment for amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci. 129: 21-24.

Alnaes E and Rahaminoff R (1975) On the role of mitochondria in transmitter release from motor nerve terminals. J. Physiol (bond) 248: 285-306.

Backhaus C, Karkoutly C, Welsch M, and Kriegstein J (1992): A mouse model of focal cerebral ischemia for screening neuroprotective drug effects. J Pharmacological Meth. 27: 27-32.

Ball AP, Hpkinson RB, Farrell ID (1979): Human botulism caused by Clostridium Botulinum type E: the Birmingham outbreak Q.J. Med. 48-473-491.

Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS, Shah BR. Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. J. Neurotrauma, 9: 197-217, 1992.

Bennett GJ and Xie YK (1998) A peripheral mononeuropathy in rat produces disorders of pain sensation like those seen in man. Pain. 33: 87-107.

Bever CT (1996) Aminopyridines in Handbook of Multiple Sclerosis, ed SD Lick, Marcel Dekker, pp 429-42.

Bever CT, Jr., Young D, Anderson PA, Krumholz A, Conway K, Leslie J, Eddington N, Plaisance KI, Panitch HS, Dhib-Jalbut S. The effects of 4-aminopyridine in multiple sclerosis patients: results of a randomized, placebo-controlled, double-blind, concentration-controlled, crossover trial. Neurol 1994; 44: 1054-1059.

Blight AR and DeCrescito V. Morphometric analysis of experimental spinal cord injury in the cat: the relation of injury intensity to survival of myelinated axons. Neuroscience 1986; 19: 321-41.

Blight AR. Morphology of chronic spinal cord injury in the cat: Analysis of myelinated axons by line-sampling. Neuroscience, 10: 521-543, 1983.

Blight AR. Morphometric analysis of a model of spinal cord injury in guinea pigs, with behavioral evidence of delayed secondary pathology. J Neurol Sci, 103: 156-171, 1991.

Bostock H, Sherratt RM, Sears TA. Overcoming conduction failure in demyelinated nerve fibres by prolonging action potentials. Nature 1978; 274: 385-387.

Bostock H, Sears TA, Sherratt RM. The effects of 4-aminopyridine and tetraethylammonium ions on normal and demyelinated mammalian nerve fibres. J Physiol(bond) 1981; 313: 301-315.

Bunge RP, Puckett WR, Bercerra JL, Marcillo A, Quencer RM. Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. In: Sell FJ, ed. Advances in neurology, vol 59, New York: Raven Press, 1993:75-89.

Davis FA, Stefoski D, Rush J. Orally administered 4-aminopyridine improves clinical signs in multiple sclerosis. Ann Neurol 1990; 27: 186-192.

Duchen, MR (1992) Ca²⁺-dependent changes in the mitochondrial energetics in single dissociated mouse sensory neurons. *Biochem J.* 283: 41-50.

Eder C (1998) Ion channels in microglia (brain macrophages) *Am. J. Physiol.* 275 (Cell Physiol. 44): C327-C342.

Fraser MO, Chuang Y, Lavelle JP, Yoshimura N, de Groat WC, Chancellor MB (2001) a reliable, nondestructive animal model for interstitial cystitis: intravesical low-dose protamine sulfate combine with physiological concentrations of potassium chloride. *Urology* 57(Suppl 1): 112

Gruner JA and Yee AK (1999) 4-Aminopyridine enhances motor evoked potentials following graded spinal cord compression injury in rats. *Brain Res.* 816:446-56.

Gruner JA, Wade CK, Menna G and Stokes BT. Myoelectric evoked potentials.

Versus locomotor recovery in chronic spinal cord injured rats. *J. neurotrauma*, 10:327-347, 1993.

Gruner JA, Yee AK, Blight AR. Histological and functional evaluation of experimental spinal cord injury: evidence of a stepwise response to graded compression. *Brain Res.*, 729: 90-101, 1996.

Gruner JA, Yee AK. 4-Aminopyridine enhances motor evoked potentials following graded spinal cord compression injury in rats. *Brain Res.* Jan 23; 816(2): 446-56, 1999.

Hamilton, MG and Lundy PM (1995) Effect of ruthenium red on voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *JPET* 273: 940-947.

Hayes KG, Blight AR, Potter PJ, Allatt RD, Hsieh JT, Wolfe DL, Lam S, Hamilton JT. Preclinical trial of 4-aminopyridine in patients with chronic spinal cord injury. *Paraplegia* 1993; 31: 216-224.

Hayes KG, Potter PJ, Wolfe DL, Hsieh JT, Delaney GA, Blight AR. 4-Aminopyridine-sensitive neurologic deficits in patients with spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1994; 11:433-446.

Hirsh JK, Quandt FN. Aminopyridine block of potassium channels in mouse neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 267: 604-611.

Hockfield S, Carolson S, Evans C, et al. Selected methods for antibody and nucleic acid probes. USA: Cold Spring Harbour Laboratory Press, p.125-130, 1993.

Jankowska. E, Lundberg A., Rudomin P. and Sykova E. Effects of 4-Aminopyridine on synaptic transmission in the cat spinal cord. *Brain Research*, 240: 117-129, 1982.

Jones RE, Heron JR, Foster DH, Snelgar RS, Mason RJ. Effects of 4-aminopyridine in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1983; 60: 353-362.

Kerasidis H, Wrathall JR and Gale K. Behavioral assessment of functional deficit in rats with contusive spinal cord injury. *J. Neurosci. Methods*, 20: 167-179, 1987.

Lowry MAR, Goldbert JI and Belosevic M (1998) Induction of nitric oxide (NO) synthesis in murine macrophages requires potassium channel activity. *Clin Exp Immunol* 111:597-603.

Lundh H (1978) Effects of 4-aminopyridine on neuromuscular transmission. *Brain Res.* 153: 307-318.

Lundh H and Thesleff S (1977) The mode of action of 4-aminopyridine and guanidine on transmitter from motor nerve terminals. *Eur. J. Pharmacol.* 42:411-12.

Lundh H, Nilsson O, Rosen I. 4-aminopyridine a new drug tested in the treatment of Eaton-Lambert syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1977; 40: 1109-1112.

Lundh H, Leander S, Thesleff S (1977): Antagonism of the paralysis produced by botulinum toxin in the rat. *J. Neurol. Sci.* 32: 29-43.

Kim SH and Chung JM (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50: 355-363.

Madge DJ (1998): Sodium channels: recent developments and therapeutic potential, In *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Volume 33 (Bristol JA Editor in chief, Academic Press, San Diego), pp 51-60.

McEvoy KM, Windebank AJ, Daube JR and Low P (1989): 3,4- Diaminopyridine in the treatment of Lambert-Eaton myasthenic syndrome (N. Engl. J. Med. 321: 1567-71).

McIlly LM, Halley F, Souness JE McKenna J, Benning V, Birrell M, Burton B, Belvisi M, Collis A, Constan A, Foster M, Hele D, Jayyosi Z, Kelley M, Maslen C, Miller G, Ouldelhkim MC, Page K, Phipps S, Pollock K, Porter B, Ratcliffe AJ, Redford EJ, Webber S, Slater B, Thybaud V, Wilsher N (2001) The discovery of RPR 200765 A, a p38 MAP kinase inhibitor displaying a good oral anti-arthritis efficacy. *Bioorg Med Chem* 9: 537-54.

Meza-Ruiz G and Tapia R (1978) [3H]GABA release in synaptosomal fractions after intracranial administration of ruthenium red. *Brain Res.* 154: 163-166.

O'Neill MJ, Bath CP, Dell CP, Hicks CA, Gilmore J, Ambler SJ, Ward MA, Bleakman D (1997): Effects of Ca²⁺ and Na⁺ channel inhibitors in vitro and in global cerebral ischaemia in vivo. *Eur J Pharmacol* 332 (2): 121-31 RIL 10mg/kg reference.

Pendlebury ST, Lee MA, Blamire AM, Styles P, and Matthews PM (2000) Correlating magnetic resonance imaging markers of axonal injury and demyelination in motor impairment secondary to stroke and multiple sclerosis. *Magn. Reson. Imaging* 18: 369-78.

Person RJ and Kuhn JA (1979) Depression of spontaneous and ionophore-induced transmitter release by ruthenium red at the neuromuscular junction. *Brain Res. Bull* 4: 669-674.

Potter PJ, Hayes KC, Hsieh JT, Delaney GA, Segal JL. Sustained improvements in neurological function in spinal cord injured patients treated with oral 4-aminopyridine: three cases. *Spinal Cord* 1998a; 36: 147-155.

Potter PJ, Hayes KC, Segal JL Hsieh JT, Brunnemann SR, Delaney GA, Tierney DS and Mason D (1998b): Randomized double-blind crossover trial of fampridine-SR (sustained release 4-aminopyridine) in patients with incomplete spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 15: 837-49.

Pyo H, Chung S, Jou I, Gwag B and Joe EH (1997) Expression and function of outward

K⁺ channels induces by lipopolysaccharide in microglia. *Mol Cells* 7: 610-614.

Qiao J, Hayes KC, Hsieh JT, Potter PJ, and Delaney GA (1997): Effects of 4-aminopyridine on motor evoked potentials with spinal cord injury. *J Neurotrauma* 14: 135-49.

Rampe D., Murawsky, M.K., Grau, J. and Lewis, E.W. The antipsychotic agent sertindole is a high affinity antagonist of the human cardiac potassium channel HERG. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286: 788-793, 1998.

Rataud J, Bebarnot F, Mary V, Pratt J and Stutzmann JM (1994): Comparative study of voltage-sensitive sodium channel blockers in focal ischaemia and electric convulsions in rodents. *Neuro Sci Lett.* 172: 19-23.

Sakurai M and Kanazawa I (1999) Positive symptoms in multiple sclerosis: their treatment with sodium channel blockers, lidocaine and mexiletine. *J Neurol. Sci.* 162: 162-168.

Saruhashi Y and Young W. Effect of mianserin on locomotory function after thoracic spinal cord hemisection in rats. *Expl Neurol.* 129: 207-216, 1994.

Savage AT. A comparison of the effects of 4-dimethylaminopyridine and 4-aminopyridine on isolated cardiac and skeletal muscle preparations. *Arch Internat Pharmacodynam Therapie* 1985; 273: 262-276.

Schwid SR, Petrie MD, McDermott MP, Tierney DS, Mason DH and Goodman AD (1997): Quantitative assessment of sustained release 4-aminopyridine for symptomatic relief of multiple sclerosis. *Neurology* 48: 817-21.

Segal JL, Pathak MS, Hernandez JP, Hember PL, Brunnemann SR and Charter RS (1999): Safety and efficacy of 4-aminopyridine in humans with spinal cord injury: A long-term, Controlled Trial. *Pharmacotherapy* 19: 713-723.

Seltzer Z, Dubner R and Shir Y (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43: 205-218.

Sherratt RM, Bostock H, Sears TA. Effects of 4-aminopyridine on normal and demyelinated mammalian nerve fibres. *Nature* 1980; 283: 570-572.

Shi R, Blight AR. Differential effects of low and high concentrations of 4-aminopyridine on axonal conduction in normal and injured spinal cord. *Neurosci* 1997; 77: 553-562.

Smith, C.P., A.T. Woods, Corbett, R., S.M. Chesson, G.M. Bores, W.W. Petko, J.E. Roehr and S. Kongsamut. Serotonergic activity of HP 184: Does spontaneous release have a role? *Neurochemical Research* 21: 573-583, 1996.

Smith, C.P., L.R. Brougham, F.P. Huger, L. Davis, J.T. Klein and R.C. Effland. HP 184 [N-(n-propyl)-N-(3-fluoro-4-pyridinyl)-1H-3-methylindol-1-amine hydrochloride]: In vitro spontaneous release of acetylcholine (ACh) and norepinephrine (NE). *Drug Dev. Res.* 30: 203-212, 1993.

Stefoski D, Davis FA, Faut M, Schauf CL. 4-Aminopyridine improves clinical signs in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1987; 21: 71-77.

Sweitzer SM, Colburn RW, Rutkowski M and DeLeo JA (1999) Acute peripheral inflammation

induces moderate glial activation and spinal IL-1 β expression that correlates with pain behavior in the rat. *Brain Res.* 829: 209-221.

Tang L and Kongsamut S (1996) Frequency-dependent inhibition of neurotransmitter release by besipirdine and HP 184. *Eur J Pharmacol* 300: 71-74.

Tang, L, Huger, F.P., Klein, J.T., Davis, L, Martin, L, Shimshock, S., Effland, R.C, Smith, C.P. and Kongsamut, S. (1998) 4-Aminopyridine derivatives: A family of novel modulators of voltage-dependent sodium-channels. *Drug Dev. Res.*, 44: 8-13.

Tang L., C.P. Smith and S. Kongsamut. Besipirdine inhibits effects of veratridine at the voltage dependent sodium channel. *Br J. Pharmacol* 116: 2468-2472, 1995.

Tapia R and Velasco I (1997) Ruthenium red as a tool to study calcium channels, neuronal death and the function of neural pathways. *Neurochem Int* 30: 137-147.

Tapia R and Meza-Ruiz G (1977) Inhibition by ruthenium red of the calcium-dependent release of [3H]GABA in synaptosomal fractions. *Brain Res.* 126: 160-166.

Tapia R, Meza-Ruiz G, Duran L and Drucker-Colin RD (1976) Convulsions or flaccid paralysis induced by ruthenium red depending on route of administration. *Brain Res.* 116: 101-109.

Tapia R and Stiges M (1982) Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res.* 250: 291-9.

Tapia R (1982) Antagonism of the ruthenium red-induced paralysis in mice by 4-aminopyridine, guanidine and lanthanum. *Neurosci Lett* 35: 615-623.

Targ EF, Kocsis JD. 4-Aminopyridine leads to restoration of conduction in demyelinated rat sciatic nerve. *Brain Res* 1985; 328: 358-361.

Targ EF, Kocsis JD. Action potential characteristics of demyelinated rat sciatic nerve following application of 4-aminopyridine. *Brain Res* 1986; 363: 1-9.

van Diemen HA, Polman CH, van Dongen TM, van Loenen AC, Nauta JJ, van Walbeek HK, Koetsier JC. The effect of 4-aminopyridine on clinical signs in multiple sclerosis: a randomized, placebo-controlled, double-blind, cross-over study. *Ann Neurol* 1992; 32: 123-130.

van Diemen HA, Polman CH, van Dongen MM, Nauta JJ, Strijers RL, van Loenen AC, Bertelsmann FW, Koetsier JC. 4-Aminopyridine induces functional improvement in multiple sclerosis patients: a neurophysiological study. *J Neurol Sci* 1993; 116: 220-226.

Yamaguchi S and Rogawski MA (1992): Effects of anticonvulsant drugs on 4-aminopyridine-induced seizures in mice. *Epilepsy Res.* 11: 9-16.

Patents:

Effland RC, Klein JT, Davis KL, Olsen GE; U.S. Patent No. 4,970,218 entitled "N-(Pyridinyl)-1H-indol-1-amines".

Hansebout RR and Blight AR; U.S. Patent No. 5,545,648 entitled "Use of 4-aminopyridine in the reduction of chronic pain and spasticity in a spinal cord injured patient".

Hansebout RR and Blight AR; "WO 94/14439 entitled The use of 4-aminopyridine in the treatment of a neurological condition".

Huger, P.P., Kongsamut, S., C.P. Smith & L Tang. US Patent No.5,776,955 entitled "Use of unsubstituted and substituted N-(pyrrol-1-yl) pyridinamines as anticonvulsant agents".

Kongsamut, S., C.P. Smith & A.T. Woods; U.S. Patent No.5,356,910 entitled "Use of N-(Pyridinyl)-1H-indol-1-amines for the Treatment of Obsessive Compulsive Disorder".

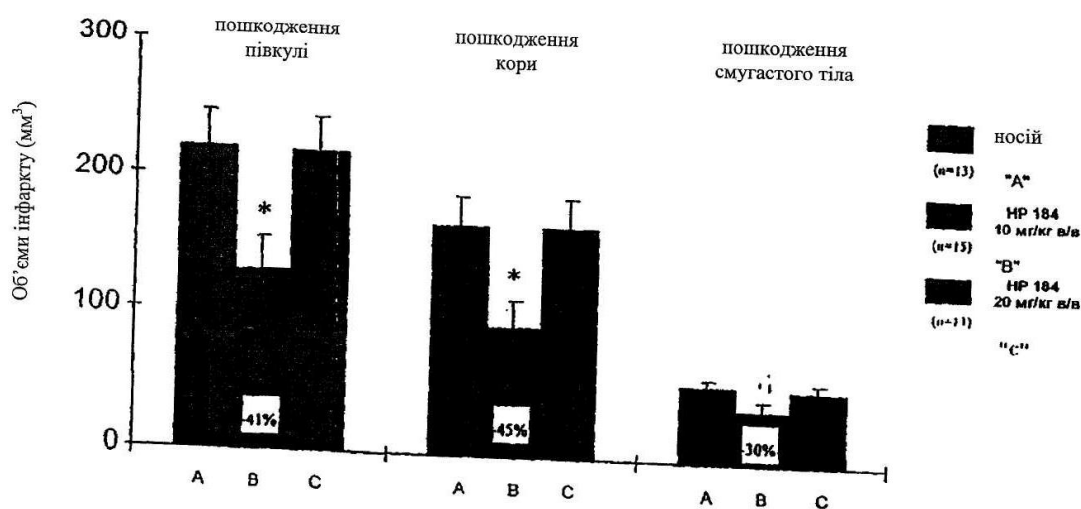
Kongsamut, S., C.P. Smith & A.T. Woods; US Patent No.5,356,910 entitled "Use of N-(Pyridinyl)-1H-indol-1-amines for the preparation of a medicament for the treatment of obsessive-compulsive disorders".

Masterson JG and Myers M; US Patent No.5,370,879 entitled "Formulations and their use in the treatment of neurological diseases".

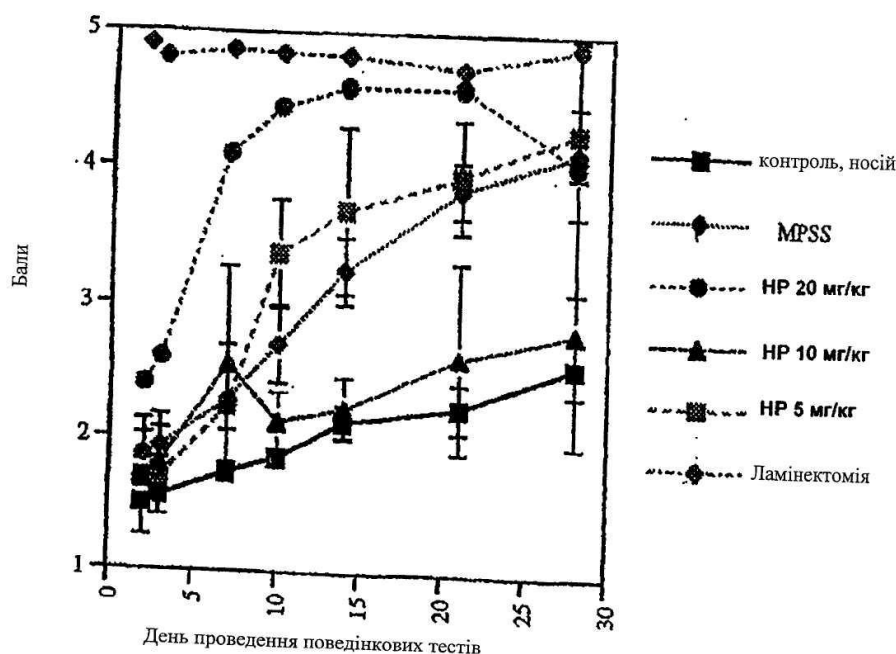
Masterson JG and Myers M; US Patent No.5,580,580 entitled "Formulations and their use in the treatment of neurological diseases".

Masterson JG and Myers M; US Patent No.5,540,938 entitled "Formulations and their use in the treatment of neurological diseases".

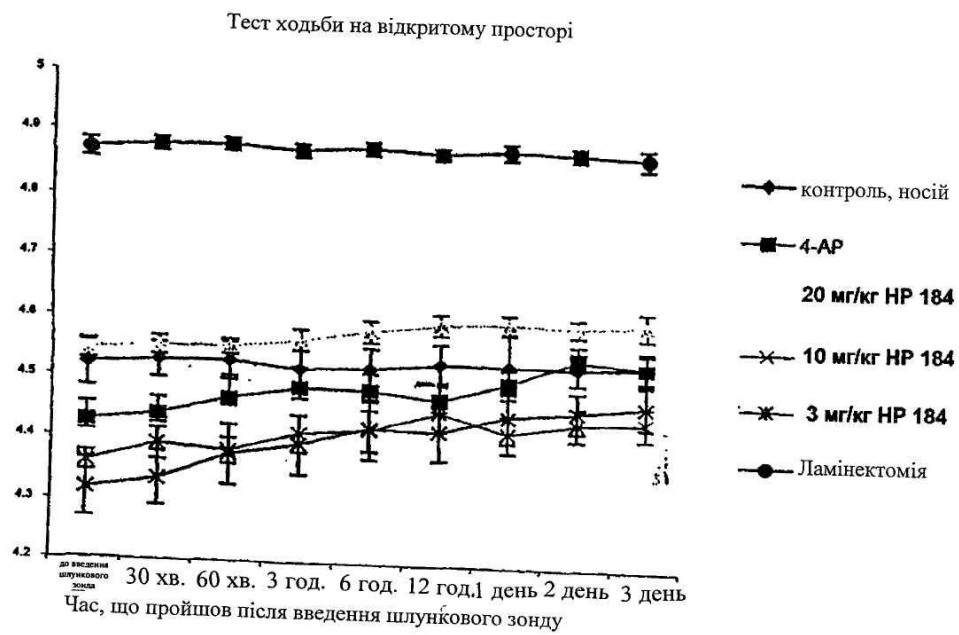
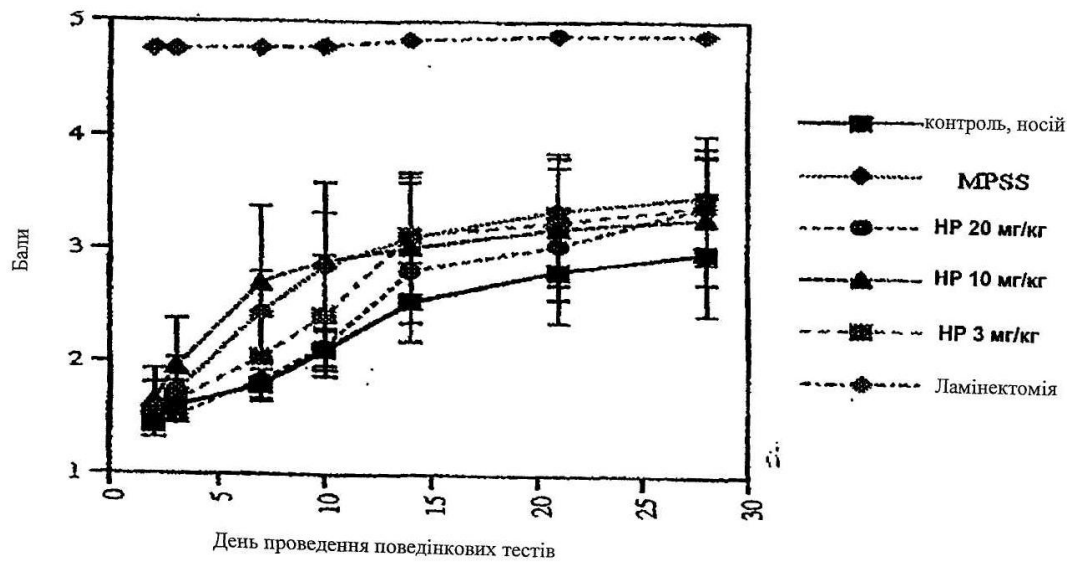
Wurtman RJ and Buyukysal R; WO 89/09600 entitled "Method and composition for treating neurological disorders".

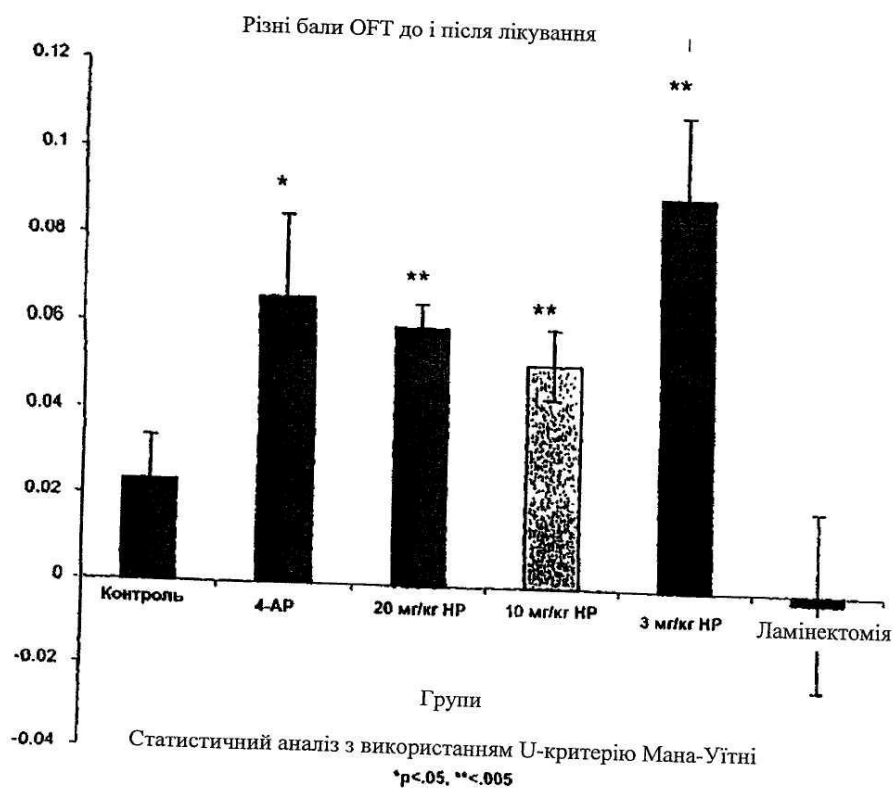


Фіг. 1



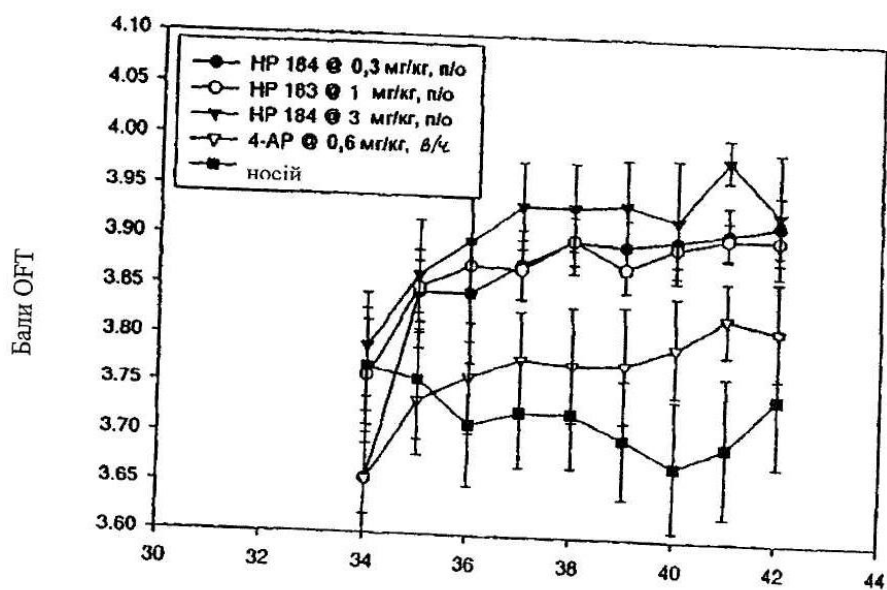
Фіг. 2





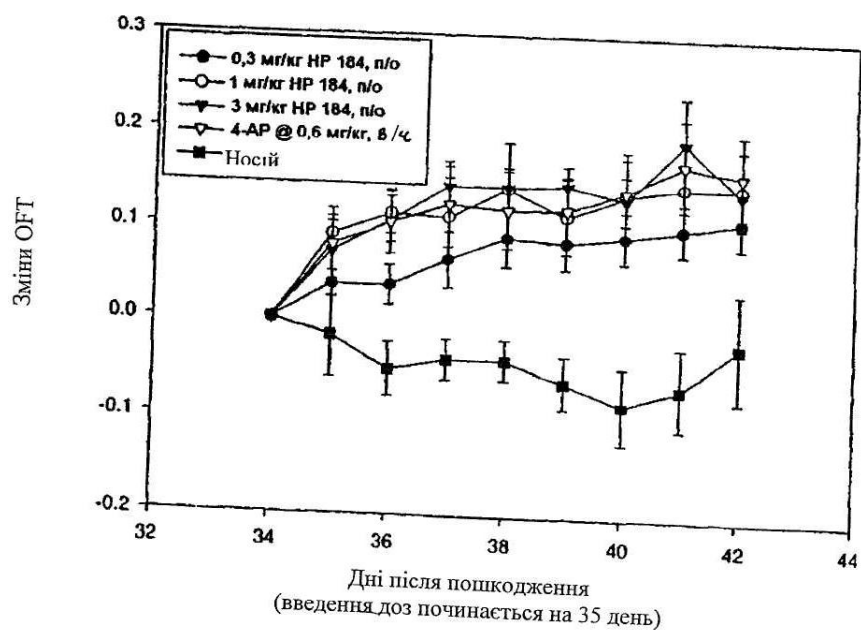
Фіг. 5

Порівняння НР 184 і 4-АР з носієм (контроль) при проведенні тесту ходьби на відкритому просторі (OFT) у щурів з встановленою моделлю помірного пошкодження спинного мозку; OFT оцінювали через 3 години після введення дози

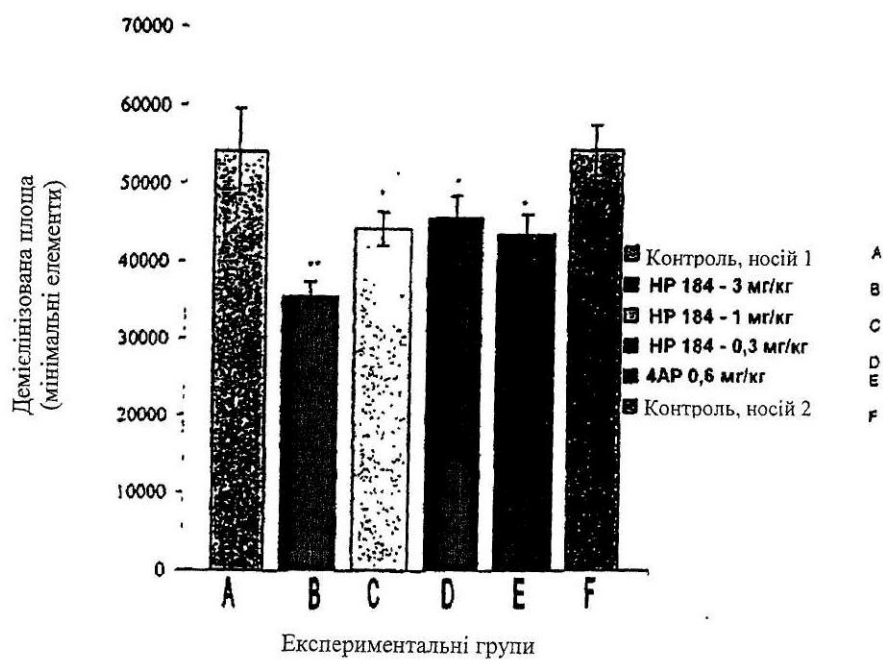


Фіг. 6

Зміна балів OFT, нормалізована для кожного щура

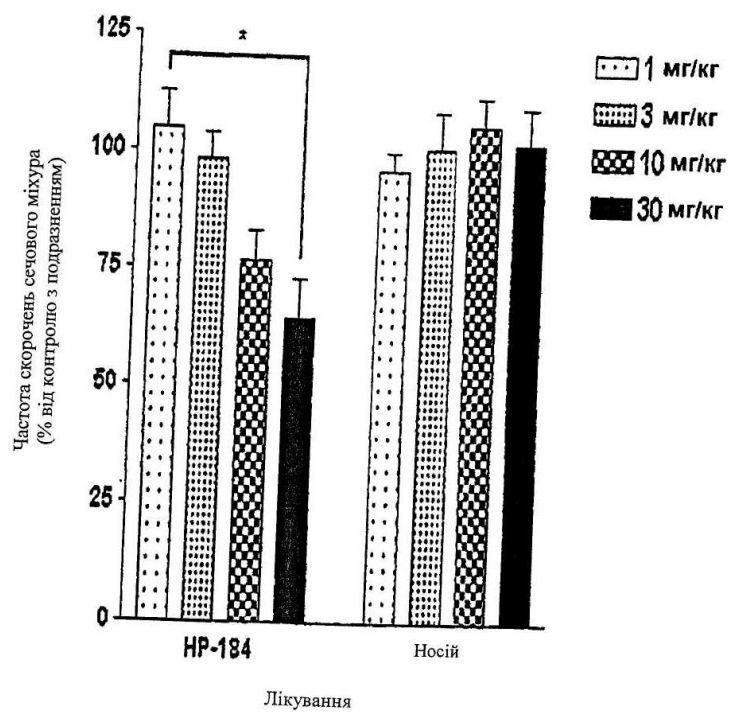


Фіг. 7

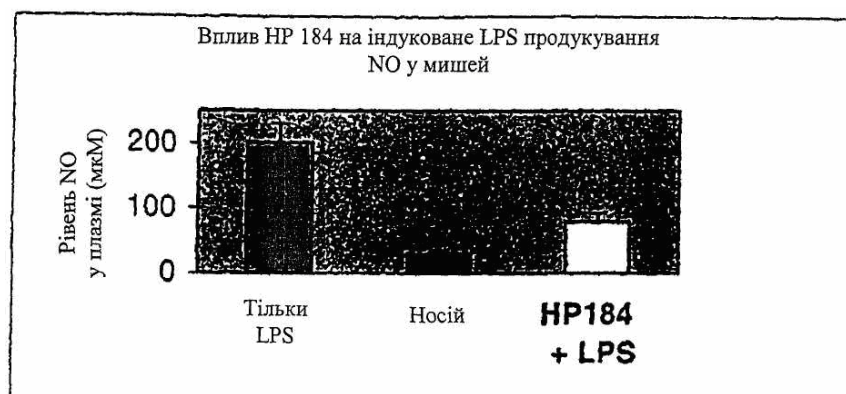


Фіг. 8

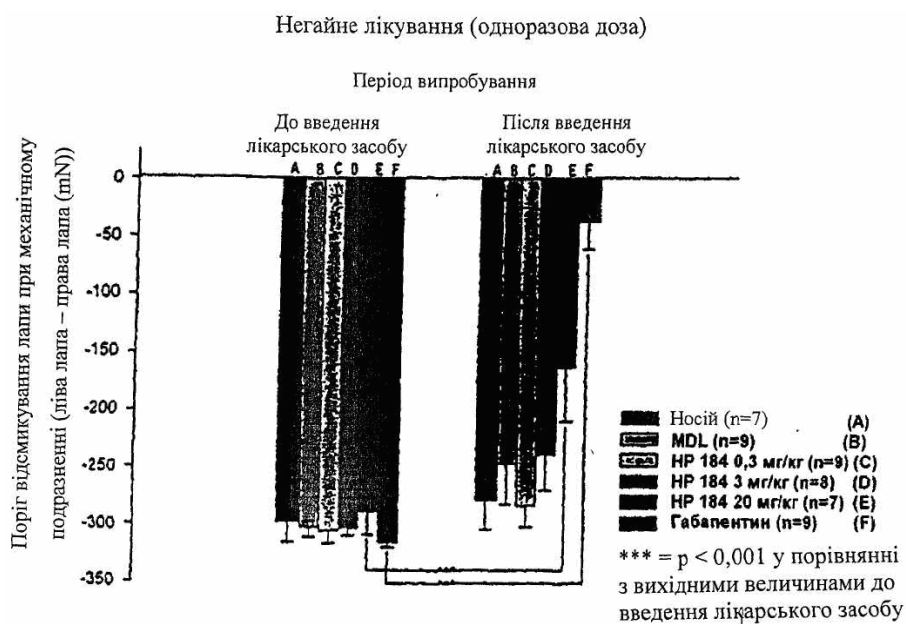
Вплив внутрішньовенного введення
HP 184 на частоту скорочень сечового
міхура після подразнення сечового міхура
(n=4 на групу)



Фіг. 9



Фіг. 10



Фіг. 11