



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 115310

(13) C2

(51) МПК

C07D 209/04 (2006.01)

C07D 209/96 (2006.01)

C07D 487/04 (2006.01)

C07D 487/10 (2006.01)

C07D 487/20 (2006.01)

A61K 31/33 (2006.01)

A61K 31/404 (2006.01)

A61K 31/438 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

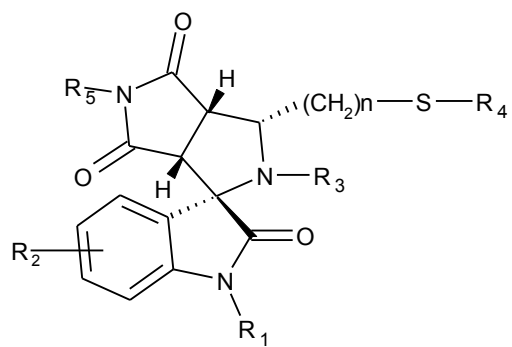
(21) Номер заявки: а 2013 14072	(72) Винахідник(и): Загорій Гліб Володимирович (UA)
(22) Дата подання заявки: 03.12.2013	(73) Власник(и): ДЕНІПЕР ЛІМІТЕД, 107 Tseriou street Block B Office 001, Lakatamia CY- 2314, Nicosia Cyprus (CY)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.10.2017	(74) Представник: Пікалова Алла Олегівна, реєстр. №91
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.06.2015, Бюл.№ 11	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 87723 C2, 10.08.2009 RU 2012103977 A, 27.09.2013 US 2008/0306102 A1, 11.12.2008 Синтез и химические свойства новых производных 3a',6a'-дигидро-2'H- спиро[индол-3,1'-пирроло[3,4-с]пиррол]- 2,4',6'(1H,3'H,5'H)-триона / Т. Л. Павловская [и др.] // Химия гетероциклических соединений. - 2013. - № 6. - С. 945-960
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.10.2017, Бюл.№ 20	

(54) СПІРОЦИКЛІЧНІ СПОЛУКИ НА ОСНОВІ ПОХІДНИХ 2-ОКСІНДОЛУ, ЯКІ МІСТЯТЬ ЯДРО СПІРО[ІНДОЛО-3,1'-ПІРОЛО[3,4-с]ПІРОЛУ] ТА ЗАЛИШКИ БІОГЕННИХ СІРКОВМІСНИХ АМІНОКИСЛОТ, СПОСІБ ЇХ ОДЕРЖАННЯ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНІ КОМПОЗИЦІЇ НА ЇХ ОСНОВІ

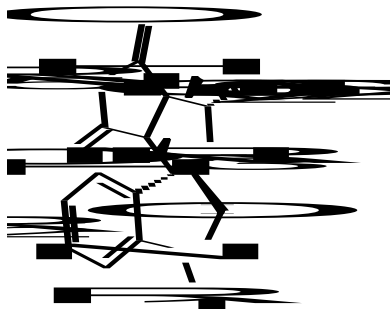
(57) Реферат:

Даний винахід стосується спіроциклічних сполук на основі похідних 2-оксіндолу, що містять ядро спіро[індоло-3,1'-піроло[3,4-с]піролу] та залишки біогенних сірковмісних амінокислот, які проявляють глкокортикоїдмодельючу активність шляхом дії на фермент 11 β -HSD1 конверсії кортизон→кортизол, і мають загальну формулу I:

UA 115310 C2



або їх фармацевтично прийнятних солей. Також винахід стосується фармацевтичних композицій на основі вказаних сполук та їх застосування для лікування захворювань, асоційованих з підвищеним продукуванням кортизолу.



Даний винахід стосується фармації, зокрема розробки нових фармакологічних засобів - сполук на основі похідних 2-оксіндолу, що містять ядро спіро[індоло-3,1'-піроло[3,4-с]піролу] та залишки біогенних сірковмісних амінокислот, які проявляють глюкокортикоїдмодулюючу активність шляхом дії на фермент 11 β -гидроксистероїддегідрогеназу (11 β -HSD1), що відповідає за конверсію кортизон \rightarrow кортизол, або шляхом пригнічення глюкокортикоїдних - (GRs), або глюкокортикостероїд-TNF-індукованих - (GfTR), або мінералокортикоїдних рецепторів, або інших мішеней, але без втручання у стероїдний гомеостаз у гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковій системі (HPA) та композицій, що їх містять, і їх застосування для лікування захворювань, у патогенезі яких важливу роль відіграють глюкокортикоїдні гормони.

Останнім часом увагу науковців привертає пошук селективних інгібіторів ферменту 11 β -HSD1, який відіграє ключову роль у периферичній конверсії неактивного кортизону у кортизол у людей (або 11-дегідро-кортикостерону у 11 β -кортикостерон у гризунів та деяких інших вищих ссавців) у клітинах. Оскільки підвищена експресія цього ферменту є важливою ланкою патогенезу ряду хвороб (цукрового діабету, метаболічного синдрому (ожиріння, пацієнтів з синдромом Кушинга, метаболічного синдрому Рівена (також відомий як синдром X або синдром стійкості до інсуліну), порушеної толерантності до глюкози, підвищеного рівня тригліцеридів у плазмі, резистентності до інсуліну, артеріальної гіпертензії, хронічного субклінічного запалення, тромбозів, інсульту та деяких інших серцево-судинних захворювань), то зниження активності цього ферменту може бути використано для терапії цих захворювань [C. Fotsch and M. Wang, J. Med. Chem., 51, 4851-4857 (2008)].

Достовірно встановлено, що патогенетично 11 β -HSD1 активується в жировій тканині у людей і гризунів з ожирінням (Livingstone et al. (2000) *Endocrinology* 131: 560-563; Rask et al. (2001) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 1418-1421; Lindsay et al. (2003) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 2738-2744; Wake et al. (2003) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 3983-3988). Підвищена активність 11 β -HSD1 у даних мишей (2-3-кратна) є дуже схожою на підвищену активність, що спостерігається при ожирінні у людини (Rask et al. (2001) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 1418-1421). Це наводить на думку, що місцеве перетворення, опосередковане 11 β -HSD1, неактивного глюкокортикоїду в активний глюкокортикоїд може впливати складним чином на чутливість до інсуліну всього тіла. Тому, блокада ферменту 11 β -HSD1 могла б привести до підвищення інсулінової чутливості і толерантності та знизити глюкокортикоїдну ексайтотоксичність у мозку [Kato et al (2013) *Front Integr Neurosci.* 7:53].

Також відомо, що глюкокортикоїди інгібують секрецію інсуліну (контрінсулярна дія), що стимулюється глюкозою у панкреатичних бета-клітин [Billaudel and Sutter (1979) *Horm. Metab. Res.* 11: 555-560]. До того ж, як у щурів з синдромом Кушинга, та і у fa/fa щурів Цукера з діабетом, секреція інсуліну, що стимулюється глюкозою, помітно знижується [Ogawa et al. (1992) *J. Clin. Invest.* 90: 497-504]. Таким чином, передбачається, що пригнічення ферменту 11 β -HSD1 буде справляти корисну дію на підшлункову залозу, включаючи посилення вивільнення інсуліну, що стимулюється глюкозою.

У світлі експериментальних даних, що вказують на спорідненість патогенезу цукрового діабету 2-го типу та метаболічного синдрому (MC), а також роль 11 β -HSD1 при цих патологічних станах [C. Day, *Diabetes Vase. Dis. Res.*, 4, 32-38 (2007); R.H. Eckel, S.M. Grundy and P.Z. Zimmet, *Lancet*, 365, 1415-1428 (2005)], також пов'язаних з глюкокортикоїдами, зокрема, гіпертензії, ожирінні, стійкості до інсуліну, гіперглікемії, гіперліпідемії, надлишку чоловічих статевих гормонів (гірсутизм, порушення менструального циклу, гіперандрогенізм) і синдромі полікістозних яєчників (PCOS), терапевтичні агенти, направлені на інтенсифікацію або придушення даних метаболічних шляхів, модулюванням сигнальної трансдукції глюкокортикоїдів на рівні 11 β -HSD1, є бажаними.

Фермент 11 β -HSD1 експресується, головним чином, в органах і тканинах, що володіють високою чутливістю до глюкокортикоїдів, зокрема, у печінці, жировій тканині, легенях, ЦНС, ендотелії аорти [J.R. Seckl and B.R. Walker, *Endocrinology*, 142 (4), 1371-1376 (2001); M. Wamil and J.R. Seckl, *Drug Discovery Today*, 12 (13/14), 504-520 (2007)], в той час як 11 β -HSD2 активується в органах-мішенях мінералокортикоїдів - у нирках, кишечнику, слинних залозах, плаценті, ендотелії судин [P.M. Stewart and Z.S. Krozowski, *Vitam. Horm.*, 57, 249-324 (1999)]. Крім того, у людини експресія 11 β -HSD1 в адипоцитах корелює зі ступенем ожиріння і не залежить від генетичних факторів. Це було підтверджено дослідженням активності даного ферменту у монозиготних близнюків, один з яких страждав ожирінням, а інший мав нормальну статуру [K. Kannisto, K.H. Pietilainen, and E. Ehrenborg et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89, 4414-4421 (2004)]. У печінці при ожирінні функціонування 11 β -HSD1 пригнічено, що призводить до зниження концентрації глюкокортикоїдів, зменшенню глюконеогенезу і адипогенезу. Ймовірно, це є захисним чинником, що запобігає приросту маси тіла і розвитку інтолерантності до глюкози

[W. Artl and P.M. Stewart, *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.*, 34, 293-313 (2005)]. Однак цей адаптаційний механізм ослаблення активності 11 β -HSD1 у печінці і, як наслідок, зменшення продукції кортизолу, відсутній при ЦД 2 типу, котрий супроводжується ожирінням, а підвищення рівня глюкокортикоїдів може вносити свій внесок в патогенез захворювання. У цьому випадку

адипоцити можуть розглядатися як первинна, а гепатоцити - як вторинна клітинна мішень для потенційних засобів впливу на інсулінорезистентність [P.M. Stewart, A. Boulton, and S. Kumar et al., *J. Clin. Endocrinol Metab.*, 84, 1022-1027 (1999)]. При MC причиною локального надлишку кортизолу та інсулінорезистентності є підвищена активність 11 β -HSD1 у жировій тканині.

Також відомо про існування цілої низки рецепторів для кортикостероїдів, які розташовані в нейронах гіпокампа, гіпоталамуса та кори головного мозку (De Kloet et (1998) *Endocr Rev.* 19(3): 269-301). Кортикостероїди мають здатність проникати через гематоенцефалічний бар'єр та зв'язуватись у мозку з двома типами рецепторів - відповідно до глюко- та мінералокортикоїдів. Рецептори до мінералокортикоїдів реалізують свій вплив через підвищення клітинної збудливості, тоді як глюкокортикоїдні рецептори (GRs) мають гальмівний вплив на нейрональну активність, а опосередкований стероїдами контроль збудливості нейронів є необхідним для обробки інформації в мозку. Кортикостероїдні рецептори мають суттєвий вплив на функціонування гіпокампа та структур, що безпосередньо приймають участь у формуванні настрою, пам'яті та здійснення контролю за функціонуванням гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникової системи (НРА). Важливість НРА вісі в контролюванні концентрації глюкокортикоїдів є очевидною з того факту, що порушення гомеостазу в НРА петлі при або надмірній або недостатній секреції або дії приводить в результаті до синдрому Кушинга або хвороби Адісона, відповідно (Miller and Chrousos (2001) *Endocrinology and Metabolism*, eds. Felig and Frohman (McGraw-Hill, New York), 4th Ed. 387-524).

Крім того, хронічний вплив високого рівня глюкокортикостероїдів призводить до когнітивних порушень та є ознакою старіння, які пов'язуються з прогресуванням деменції (Wyrgoll et al (2011) *Front Neuroendocrinol.* 32(3): 265-286.). Як у старих тварин так і у людей похилого віку зниження загальних пізнавальних функцій пов'язують з тривалим впливом глюкокортикоїдів та рівнем експресії 11 β -HSD1 (Alasdair M.J. MacLulich (2012), *Neurobiology of Aging* 33(1): 207-207). У людей похилого віку з хронічно високим рівнем кортизолу відмічається зменшення щільності нейронів гіпокампа та розвитком його атрофії (Bauer (2005) *Stress.* 8(1): 69-83). Підвищення з віком рівня глюкокортикоїдів супроводжується зниженням порогу збудження нейронів гіпокампа, що викликає порушення процесів консолідації пам'яті у старих щурів. Подібна ситуація має місце при нейродегенеративних захворюваннях (зокрема при хворобі Альцгеймера) і супроводжується зниженням когнітивно-мнестичних функцій (McCormick and Mathews (2010) *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 34(5): 756-65). Обробка первинних клітин гіпокампа карбенооксолоном, що є 11 β -HSD1 інгібітором, захищає клітини від опосередкованого глюкокортикоїдами загострення нейротоксичності глутамату (Rajan et al. (1996) *J. Neurosci.* 16: 65-70). Додатково було встановлено, що генетичний дефіцит 11 β -HSD1 у мишей захищає від пов'язаної з глюкокортикоїдами дисфункції гіпокампа, яка пов'язана зі старінням (Yau et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 4716-4721). Таким чином, вважають, що інгібування 11 β -HSD1 ослабить вплив глюкокортикоїдів в мозку і захистить його тканини від шкідливої дії глюкокортикоїдів на нейронну функцію, включаючи когнітивні порушення, деменцію, і/або депресію.

Так, при експериментальному цукровому діабеті та гострому порушенні мозкового кровотоку, призначення метирапону (нестероїдного блокатора стероїдної 11 β -гідроксилази), у зоні CA1 гіпокампа та сомато-сенсорній корі головного мозку щурів відмічається зниження щільності деструктивно-змінених нейронів поряд із збереженням площі та щільності морфологічно неушкоджених нейроцитів, захищає від ішемії та ексайтотоксичності індукованих пошкодженням мозку у гризунів [Drouet (2012) *Eur J Pharmacol.* 5, 682(1-3): 92-8]. Підвищений рівень кортикостерону у мозку щурів при гіпобаричній гіпоксії викликає нейродегенеративні зміни і пов'язується із впливом на центральні GRs, тоді як інгібування GRs може забезпечити терапевтичний ефект у поліпшенні індукованого погіршення пам'яті на тлі гіпобаричної гіпоксії [Baitharu et al (2013) *Behav Brain Res.* 240:76-86]. Введення метирапону з 3 по 7-й день на тлі гіпобаричної гіпоксії у щурів, дозволяє усунути індуковане гіпоксією збільшення рівня кортикостерону, та призводить до зниження перекисного окиснення, нейродегенерації і поліпшення стану внутрішньоклітинного енергетичного обміну. Крім того, введення екзогенного кортикостерону поряд з метирапоном при гіпоксії знижує нейрозахисну дію метирапону, що вказує на роль кортикостерону в посередництві індукованих гіпобаричною гіпоксією нейродегенерації та погіршення пам'яті [Schaaf et al (2000) *Stress.* 3(3): 201-208. Review; Baitharu et al (2012) *Behav Brain Res.* 228(1): 53-65]. Застосування метирапону або антагоністів

глюкокортикоїдними рецепторів (GRA) і антагоністів рецепторів прогестерону (PRA) - RU38486 (mifepristone) чи неперпидного антагоніста глюकोкортикоїдних рецепторів 1 типу (CRH-R1) R121919 хоча і підтвердило перспективність корекції рівня глюкокортикостероїдів з метою нейропротекції, однак у клініці їх використання не доцільне, оскільки вони порушують гомеостаз в HPA [Belda et al (2012) *Horm Behav.* 62(4): 515-524; Bluthgen et (2013) *Aquat Toxicol.* 144-145C: 96-104].

Першим і найбільш вивченим екзогенним неселективним інгібітором 11 β -HSD рослинного походження є тритерпеноїди (сапогенін) - гліцеретова кислота та її диглюкуронід - гліциризинова кислота, яка міститься у коренях з кореневищами солодки голої *Glycyrrhiza glabra* L. і уральської *G. uralensis* F [Г.А. Толстиков, Л.А. Балтина, Н.Г. Сердюк, *Хим. фарм. журн.*, 8, 5-14 (1998)]. Гемісукцинат гліцеретової кислоти (карбенексолон), відомий з середини 50-х рр. минулого століття як противиразовий засіб, також демонструє в експерименті на опасистих мишах ефективне зниження рівня інсуліну і ліпідів у плазмі [A.M. Nuotio-Antar, D.L. Hachey, and A.H. Nasty, *Am. J. Physiol.: Endocrinol. Metab.*, 293, E1517-E1528 (2007)]. У здорових добровольців і пацієнтів з ЦД 2 типу застосування карбенексолону підвищує чутливість печінки до інсуліну, а також спричиняє нейропротекторну дію на моделі ішемічного інсульту внаслідок зниження рівня продукції глюкокортикоїдів у тканинах мозку [Beraki et al (2013) *PLoS ONE* 8(7): e69233]. В двох плацебо контрольованих перехресних дослідженнях введення карбенексолону посилювало швидкість мовлення і вербальну пам'ять (Sandeep et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. Early Edition*: 1-6). Однак препарат не отримав клінічного застосування як антидіабетичний засіб через здатність поряд з інгібуванням 11 β -HSD1 знижувати активність ще й 11 β -HSD, що призводить до ренального надлишку мінералокортикоїдів і, як наслідок, до реабсорбції іонів натрію, до гіпокаліємії і гіпертензії. Крім того, карбенексолон характеризується низькою ліпофільністю, адже він погано проникає у жирову тканину - місце основної експресії 11 β -HSD1 [K.A. Hughes, S.P. Webster and B.R. Walker, *Expert Opin. Investig. Drugs*, 17 (4), 481-496 (2008)].

Нещодавно була показана патогенетична доцільність блокування тканинної активності глюкокортикостероїдів введенням експериментальних сполук GRA-CORT 108297 або LLY-2707 [Belanoff et al (2011) *Eur J Pharmacol.* 655(1-3): 117-120; Belanoff et al (2012) *Diabetes Obes Metab.* 12(6): 545-7; Sindelar et al (2013) *J Pharmacol Exp Ther.* 25: 1-25] для лікування метаболічного синдрому подібного до цукрового діабету та збільшення ваги, індукованих при застосуванні атипичних антипсихотиків (AAPDs), наприклад, *olanzapine*. Аналогічну позитивну дію відносно зменшення ваги щурів спостерігали й при застосуванні RU38486 (mifepristone) на тлі порушень HPA гомеостазу глюкокортикостероїдів, викликаних *olanzapine* (Beebe et al (2006) *Behav Brain Res.* 171(2): 225-229).

Про інгібітори 11 β -HSD1 нестероїдної структури на основі амідів іншої структури повідомляють у EP2540723A1, WO 2004/089470, WO 2004/089896, WO 2004/056745 і WO 2004/065351. Додатково про інгібітори 11 β -HSD1, що є нестероїдними структурами, повідомляють в US 2005/0282858, US 2006/0009471, US 2005/0288338, US 2006/0009491, US 2006/0004049, US 2005/0288317, US 2005/0288329, US 10 2006/0122197, US 2006/0116382 і US 2006/0122210, INCY0035 (US 2007/0066584). Найбільш близькою за структурою до представлених у даному винаході сполук є аналоги на основі 2-оксіндола-спіропіперидинамідів (US 20080306102 A1), однак, автори не вказують на їх церебропротекторні, цитопротекторні, антиоксидантні, антигіпоксанти, антидіабетичні властивості та рівень токсичності, до того ж сполуки, які містять фрагмент спіро[індолінон-3,4'-піперидину] можуть потенційно викликати небажані ефекти з боку нервової системи, зокрема, характерні для речовин зі спорідненою до них будовою природних алкалоїдів, які проявляють токсичні властивості стосовно нервової провідності, наприклад, сурогатоксин, просурогатоксин та неосурогатоксин з молюску (*Babylonia japonica*) справляють холіно- та адреноблокуючу дію [Ayajiki et al (1998) *Jpn J Pharmacol.* 78(2): 217-23], до того ж дуже близькі за хімічною структурою речовини були описані раніше як місцево анестезуючі засоби [Kornet MJ, Thio AP (1976) *J. Med. Chem* 19 (7): 892-898].

Перша фаза клінічних випробувань іншого нестероїдного інгібітора 11 β -HSD1 - фторованого тіазолону (AMG-221) підтвердила його добру переносимість та пригнічуючу активність щодо 11 β -HSD1 у пацієнтів з ожирінням. Друга фаза досліджень AMG-221 стартувала в 2007 р., проте два роки потому розробники як і раніше позиціонували його як речовину, що знаходиться на першій фазі клінічних випробувань [S.P. Webster and T.D. Pallin, *Expert Opin. Ther. Patents*, 17(12), 1407-1422 (2007)].

До того ж деякі із запропонованих інгібіторів 11 β -HSD1 є недостатньо активними порівняно із запропонованими у даному патенті сполуками. Так, сполука нестероїдної природи BVT-2733 (3-хлор-2-метил-N-(4-(2-(4-метилпіперазин-1-іл)-2-оксоетил)тіазол-2-іл)бензолсульфонамід гідрохлорид-специфічний інгібітор 11 β -HSD1) при введенні на 3 та 7 години після реперфузії в

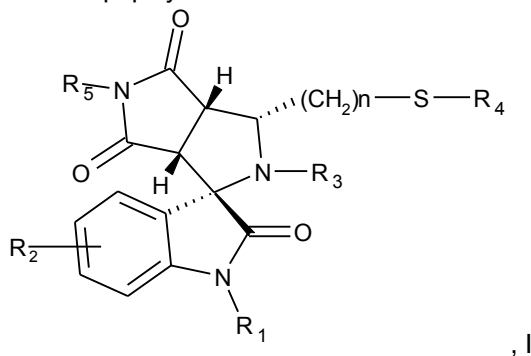
дозах 60 мг/кг і 30 мг/кг зменшує об'єм ішемічного ураження мозку у щурів (Beraki et al (2013) PLoS ONE 8(7): e69233). Однак ця сполука потребує введення у 3-6 разів більших дозах, ніж сполуки представлені у даному винаході. До того ж не відомі його властивості щодо апоптозу.

Ще одним перспективним напрямком застосування інгібіторів 11 β -HSD1 є лікування глаукоми, адже продукція водянистої вологи ока здійснюється у непігментованих епітеліальних клітинах (NPE), і її стік здійснюється через клітини трабекулярної мережі. 11 β -HSD1 локалізована в NPE клітинах (Stokes et al. (2000) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41: 1629-1683; Rauz et al. (2001) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 42: 2037-2042) і її функція, ймовірно, стосується збільшення глюкокортикоїдної активності у цих клітинах. Це підтверджується тим, що концентрація вільного кортизолу значно перевищує концентрацію кортизону у водянистій волозі ока (14:1 співвідношення). Функціональне значення 11 β -HSD1 в оці оцінене, застосовуючи інгібітор-карбенооксолон на здорових добровольцях (Rauz et al. (2001) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 42: 2037-2042). Через сім днів після обробки карбенооксолоном внутрішньоочний тиск (IOP) знизився на 18 %. Таким чином, передбачають, що інгібування 11 β -HSD1 у оці знизить місцеві концентрації глюкокортикоїдів та IOP, надаючи корисну дію в лікуванні глаукоми.

Таким чином, існує постійна потреба в нових і поліпшених лікарських засобах, які мають глюкокортикостероїдмодуючою активністю, у тому числі антидіабетичною, нейропротекторною дією при недиференційованій терапії інсульту (без остаточної верифікації його підтипу) у різні періоди гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК), у відновний період інсульту та черепно-мозкової травми, у пацієнтів з хронічною цереброваскулярною патологією (на тлі цукрового діабету), для комплексної терапії хвороби Альцгеймера та енцефалопатії різного походження (дисциркуляторна, алкогольна, інфекційно-токсична), для комплексної терапії цукрового діабету, ретинодегенеративних захворювань ока, у складі комплексного лікування метаболічного синдрому, ожиріння, пацієнтів з синдромом Кушинга, метаболічного синдрому Рівена (також відомого як синдром X або синдром стійкості до інсуліну) і інших захворювань. Як очікується, такі терапевтичні агенти знижуватимуть концентрацію гідрокортизолу шляхом дії на фермент конверсії кортизон \rightarrow кортизол - 11 β -HSD1, або пригнічення GRs-, або GPCR, або інші мішені, але без втручання у стероїдний гомеостаз.

Винахідники поставили перед собою задачу створити сполуки та фармацевтичні композиції, які б допомогли задовольнити вказані потреби.

Поставлена задача вирішується створенням спіроциклічних сполук на основі похідних 2-оксіндолу, які містять ядро спіро[індола-3,1'-пірола[3,4-с]-пірола] та залишки біогенних сірковмісних амінокислот, загальної формули I:



де:

R₁ являє собою H, Me-, Et-, Alkyl-, -Bn;

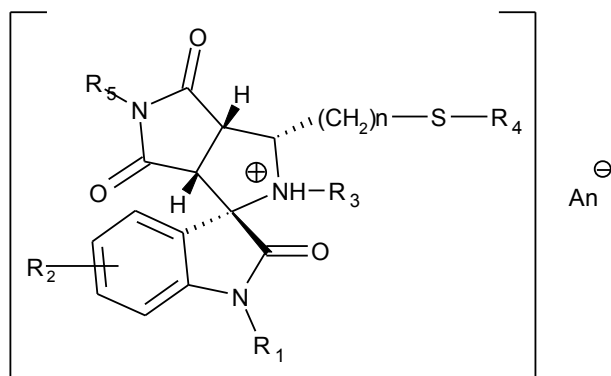
R₂ являє собою H, 5-Me, 5-F, 5-Br, -5-OCF₃, 5-NO₂;

R₃ являє собою H або -N=O;

R₄ являє собою залишки біогенних сірковмісних амінокислот, вибраних з метіоніну (n=2, R₄=Me), етіоніну (n=2, R₄=Et), цистеїну (n=1, R₄=H) чи алкілпохідних цистеїну, де R₄=Bn або -CH₂CO₂Et, або Alkyl-;

R₅ являє собою H, або залишки Ar, де Ar являє собою p-Tolyl, m-Tolyl, 2-(HO)Ph-, 3-(HO)Ph-, 4-Br-Ph-; 4-NO₂-Ph-; 2-NO₂-Ph-; 2-Br-Ph- або 4-(HOOC)Ph-,

та їх фармацевтично прийнятні солі формули II:



II

де An^- є вибраним з групи, що складається з хлориду, броміду, йодиду, сукцинату, гемісукцинату, L-аспартату, тартрату або гідротартрату, нікотинату, L-аскорбату, малеату або гідромалеату, фумарату, гідрофумарату, цитратів, L-лактату, L-малату, фосфату, сульфату, бензоату, ацетату, піволату, глутарату, глутамату, аспарагіна. А також відповідні їм сольвати, гідрати, енантіомери тощо.

Вказані сполуки проявляють глюкокортикоїдмоделюючу активність шляхом дії на фермент 11β -HSD1 конверсії кортизон→кортизол, або пригнічення GRs-, або GPCR-рецепторів або інші мішені, але без втручання у стероїдний гомеостаз у HPA, а також проявляють антиоксидантну, антигіпоксикантну, церебропротекторну та цитопротекторну дію.

Згідно з одним з варіантів втілення винаходу пропонується застосовувати вищевказані сполуки для лікування захворювань, в патогенезі яких ключову роль відіграє підвищення продукції кортизолу. Зокрема, для лікування будь-якого одного з наступних захворювань або будь-якої комбінації двох або більше з наступних захворювань: для комплексної терапії цукрового діабету, у складі недиференційованої терапії інсульту (без остаточної верифікації його підтипу) у різні періоди ГПМК, у відновний період інсульту та черепно-мозкової травми, у пацієнтів хронічною цереброваскулярною патологією (у тому числі й на тлі цукрового діабету), для комплексної терапії хвороби Альцгеймера та енцефалопатії різного походження (дисциркуляторна, алкогольна, інфекційно-токсична), ретинодегенеративних захворювань ока, у складі комплексного лікування метаболічного синдрому (ожиріння, пацієнтів з синдромом Кушинга, метаболічного синдрому Рівена (також відомий як синдром X або синдром стійкості до інсуліну) і інших захворювань, стійкість до інсуліну; гіперглікемія; гіпертензія; гіперліпідемія; когнітивні порушення; депресія; деменція; глаукома; серцево-судинні захворювання; остеопороз; запалення; метаболічний синдром; надлишок чоловічих статевих гормонів або синдром полікістозних яєчників (PCOS).

Згідно ще з одним варіантом втілення винаходу сполуки загальної формули I або II пропонується застосовувати для виробництва фармацевтичних композицій у комбінації з фармацевтично прийнятними допоміжними речовинами, які забезпечують їх застосування з готових лікарських засобів у вигляді відповідних лікарських форм, таких як таблетки, пілюлі, порошки, пастилки, саше, суспензії, емульсії, розчини для перорального застосування, сиропи, аерозолі (в твердому вигляді або в рідкому середовищі), мазі, краплі, м'які і тверді желатинові капсули, супозиторії, розчини для ін'єкцій, інфузій.

Крім того, пропонується використання зазначених сполук для створення лікарських засобів в ефективній разовій дозі від 0,25 до 50 мг/кг (кратність прийому в залежності від захворювання, але не більш ніж 200 мг/кг).

Винахід також пропонує спосіб одержання сполук загальної формули I шляхом двостадійного синтезу на основі трикомпонентної енантіоселективної реакції конденсації, яка полягає у one-pot конденсації відповідних пірол-2,5-діонів з 1H-індол-2,3-діонами та біогенними сірковмісними амінокислотами у середовищі полярних розчинників у суміші з водою. Придатними розчинниками зокрема є метиловий або ізопропіловий, або етиловий спирти або ацетонітрил, які використовують в суміші з водою у співвідношеннях від 2:1 до 10:1. Зокрема, найбільш прийнятним є спосіб одержання зазначених сполук, де найбільш переважним співвідношенням органічного розчинника та води є співвідношення 3:1.

Згідно з іншим варіантом втілення винахід пропонує спосіб одержання солей загальної формули II, який полягає у розчиненні відповідної основи сполук формули I у етанолі, або суміші етанолу з водою, або бутанолі та додаванні водного або спиртового розчину відповідної

органічної або неорганічної кислоти відповідно до формули II з наступним випарюванням у вакуумі.

Крім того, даний винахід стосується композицій, що містять сполуки формули (I) або їх фармацевтично прийнятні солі формули II і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій.

Крім того, даний винахід, стосується способів нейропротекції, зокрема, шляхом впливу на гіпоксію, перекисне окиснення ліпідів та глюкокортикоїдну ексайтотоксичність, зниженням продукції гідрокортизолу у мозку та інших тканинах, у тому числі при дії на фермент конверсії кортизон→кортилол - 11β -HSD1, або пригніченням GRs-, або GPCR-рецепторів, або блокуванням тканинної активності глюкокортикостероїдів опосередковано через інші мішені, але без порушення стероїдного гомеостазу, сполук формули I або їх фармацевтично прийнятними солями II.

Крім того, даний винахід стосується способів інгібування активності 11β -HSD1, що включає взаємодію 11β -HSD1 із сполукою формули I або їх фармацевтично прийнятними солями формули II.

Крім того, даний винахід стосується способів інгібування перетворення кортизону в кортизол (чи 11 -дегідрокортикостерону у 11β -кортикостерон у гризунів та деяких інших ссавців) у клітинах тканин людини та тварин, що включає взаємодію клітин із сполуками формули I або їх фармацевтично прийнятними солями формули II.

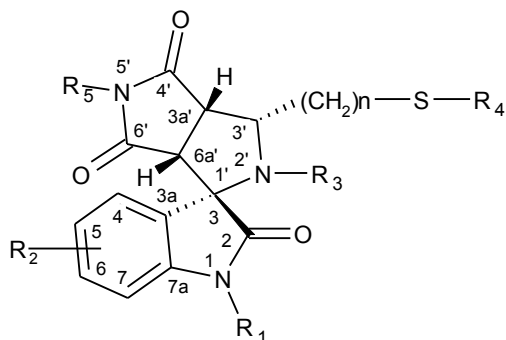
Крім того, даний винахід стосується способів інгібування синтезу кортизолу в клітинах людини та тварин, що включають взаємодію клітин із сполуками формули I або їх фармацевтично прийнятними солями формули II.

Крім того, даний винахід стосується способів лікування різних захворювань, включаючи будь-яке одне з наступних захворювань або будь-яку комбінацію двох або більше з наступних захворювань: у складі недиференційованої терапії інсульту (без остаточної верифікації його підтипу) у різні періоди ГПМК, у відновний період інсульту та черепно-мозкової травми, у пацієнтів хронічною цереброваскулярною патологією (у тому числі й на тлі цукрового діабету), для комплексної терапії хвороби Альцгеймера та енцефалопатії різного походження (дисциркуляторна, алкогольна, інфекційно-токсична), цукрового діабету, для комплексної терапії ретинодегенеративних захворювань ока, у складі комплексного лікування метаболічного синдрому (ожиріння, пацієнтів з синдромом Кушинга, метаболічного синдрому Рівена (також відомий як синдром X або синдром стійкості до інсуліну) і інших захворювань, стійкість до інсуліну; гіперглікемія; гіпертензія; гіперліпідемія; когнітивні порушення; депресія; деменція; глаукома; серцево-судинні захворювання; остеопороз; запалення; метаболічний синдром; надлишок чоловічих статевих гормонів або синдром полікістозних яєчників (PCOS), що включає введення пацієнту терапевтично ефективної кількості сполук формули I або їх фармацевтично прийнятних солей формули II.

Крім того, даний винахід стосується сполуки формули I або їх фармацевтично прийнятних солей формули II для застосування в лікуванні тварин.

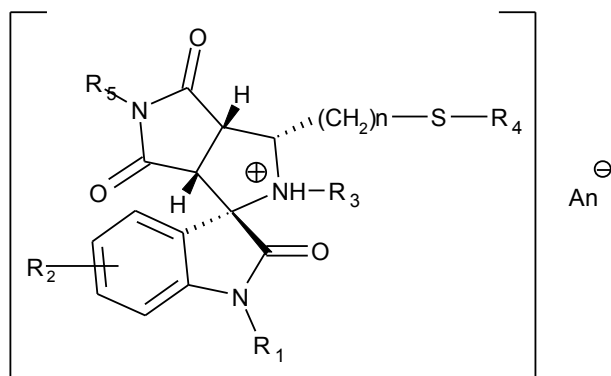
Крім того, даний винахід стосується застосування сполук формули I або їх фармацевтично прийнятних солей формули II для одержання лікарського засобу для застосування для терапії зазначених вище хворобливих станів.

Даний винахід пропонує нові фармакологічні засоби - спіроциклічні сполуки похідних 2-оксіндолу, що містять ядро спіро[індола-3,1'-піроло[3,4-с]-піролу] та залишки біогенних сірковмісних амінокислот (метіоніну, етіоніну, цистеїну та алкілпохідних цистеїну), які мають формулу I:



, I

або їх фармацевтично прийнятні солі формули II:



II

де

R_1 являє собою H, Me-, Et-, Alkyl-, -Bn;

R_2 являє собою H, 5-Me, 5-F, 5-Br, -5-OCF₃, 5-NO₂;

5 R_3 являє собою H або -N=O;

R_4 являє собою залишки біогенних сірковмісних амінокислот (метіоніну ($n=2$, $R_4=Me$), або етіоніну ($n=2$, $R_4=Et$), або цистеїну ($n=1$, $R_4=H$) чи алкілпохідних цистеїну, де $R_4=Bn$ або -CH₂CO₂Et, або Alkyl-);

10 R_5 являє собою H або залишки Ar, де Ar являє собою p-Tolyl, m-Tolyl, 2-(HO)Ph-, 3-(HO)Ph-, 4-Br-Ph-; 4-NO₂-Ph-; 2-NO₂-Ph-; 2-Br-Ph-; 4-(HOOC)Ph-;

причому

15 An^- є вибраним з групи, що складається з хлориду, броміду, йодиду, сукцинату, гемісукцинату, L-аспартату, тартрату або гідротартрату, нікотинату, L-аскорбату, малеату або гідромалеату, фумарату, гідрофумарату, цитратів, L-лактату, L-малату, фосфату, сульфату, бензоату, ацетату, піволату, глутарату, глутамату, аспарагіну. Наведені приклади фармацевтично прийнятних солей включають, але не обмежуються наведеними, солі мінеральних або органічних кислот з основними залишками, такими як аміни; солі лужних металів або органічні солі кислотних залишків, таких як карбонові кислоти; і подібні. Фармацевтично прийнятні солі згідно з даним винаходом включають загальноприйняті нетоксичні солі вихідної сполуки, одержані, наприклад, з нетоксичних неорганічних або органічних кислот. Фармацевтично прийнятні солі, згідно з даним винаходом, можна синтезувати з вихідної сполуки, яка є основою, загальноприйнятими хімічними способами. Зазвичай дані солі можна одержати шляхом реакції форми вільної основи даних сполук із стехіометричною кількістю відповідної кислоти у воді або в органічному розчиннику, або в їх суміші; зазвичай неводне середовище етанолу, ізопропанолу або ацетонітрилу є переважним. Список відповідних солей можна знайти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418 і J. Pharm. Sci., 66, 2 (1977), кожен з яких включений в даний документ в повному обсязі шляхом посилання.

30 Термін "фармацевтично прийнятний" застосовують в даному документі відносно тих сполук, матеріалів, композицій, і/або лікарських форм, які є безпечними та ефективними в межах ретельної медичної оцінки, придатними для застосування в контакт з тканинами людини і тварини без перевищуючої норму токсичності, подразнення, алергічної реакції або іншої проблеми або ускладнення з порівняним прийнятим співвідношенням ризик/очікувана користь.

35 Всі сполуки та їх фармацевтично прийнятні солі можна одержати в різних твердих формах, включаючи сольватовані або гідратовані форми. У деяких варіантах винаходу тверда форма являє собою кристалічну форму. Зокрема, спосіб одержання полягає у екологічно прийнятній one-pot енантіоселективній конденсації відповідних пірол-2,5-діонів з 1H-індол-2,3-діонами та біогенними сірковмісними амінокислотами у полярному середовищі, у тому числі, у середовищі метилового або ізопропілового, або етилового спиртів або ацетонітрилу у суміші з водою у співвідношеннях від 2:1 до 10:1. Найбільш прийнятним співвідношенням спирт:вода є співвідношення 3:1.

40 Спосіб одержання солей сполук загальної формули I полягає у розчиненні відповідної основи цих сполук у етанолі, або суміші етанолу з водою, або бутанолі та додаванні водного або спиртового розчину відповідної органічної або неорганічної кислоти з наступним випаровуванням у вакуумі.

Способи одержання, очищення і аналізу різних твердих форм є стандартними в даній галузі техніки і включають, наприклад, рентгенівську порошкову дифракцію, диференціальну скануючу колориметрію, термогравіметричний аналіз, динамічну сорбцію пари, FT-IR, способи комбінаційного розсіювання, ЯМР, титрування по Карлу-Фішеру і т.д.

У деяких варіантах втілення винаходу сполуки згідно з даним винаходом і їх солі є практично повністю виділеними. Під "практично повністю виділеними" мають на увазі те, що сполука щонайменше частково або практично повністю відділена від оточення, в якому вона утворюється або виявлена. Часткове виділення може включати, наприклад, композицію, збагачену сполукою згідно з даним винаходом. Практично повне виділення може включати композицію, що містить щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 60 %, щонайменше приблизно 70 %, щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше приблизно 95 %, щонайменше приблизно 97 % або щонайменше приблизно 99 % за вагою відповідної сполуки згідно з даним винаходом або її солі. Способи виділення сполуки і її солей є стандартними в даній галузі техніки.

Сполуки, що пропонуються даним винаходом, вже у наномолярних концентраціях можуть спричиняти нейропротекторну дію, у тому числі, шляхом зниження концентрації гідрокортизолу у мозку, шляхом дії на фермент 11 β -HSD1 конверсії кортизон→кортизол, або пригнічення GRs-, або G1TR-рецепторів або інші мішені, але без втручання у стероїдний гомеостаз у HPA. Сполуки, їх композиції, а також способи, описані в даному винаході, допомагають знизити концентрації гідрокортизолу. Мається на увазі, що термін "зниження концентрації гідрокортизолу (кортикостерону)" стосується здатності зменшувати активність відповідного фермента або рецептора. Крім того, даний винахід стосується способів інгібування перетворення кортизолу в кортизол в клітині або інгібування синтезу кортизолу в клітині, де перетворення або синтез кортизолу опосередкований, щонайменше частково, 11 β -HSD1 активністю.

Крім того, даний винахід стосується способів інгібування перетворення кортизолу в кортизол в клітині або інгібування синтезу кортизолу в клітині, де перетворення або синтез кортизолу опосередкований, щонайменше частково, 11 β -HSD1 активністю. Способи вимірювання швидкості перетворення кортизолу в кортизол і навпаки, також як способи вимірювання концентрацій кортизолу і кортизолу в клітинах, є стандартними в даній галузі техніки.

Крім того, даний винахід стосується способів підвищення чутливості до інсуліну клітин за рахунок зняття контрінсулярної дії глікокортикостероїдів при взаємодії клітин із сполуками, представленим у даному документі. Способи вимірювання чутливості до інсуліну є стандартними у даній галузі техніки.

Крім того, даний винахід стосується способів лікування захворювання, пов'язаного з активністю або експресією, включаючи аномальну активність і підвищену експресію 11 β -HSD1, в індивідуума введенням йому терапевтично ефективної кількості або дози відповідної сполуки згідно з даним винаходом або її фармацевтично прийнятною солі, або фармацевтичної композиції на їх основі. Приклади захворювань можуть включати будь-яке захворювання, розлад або стан, який безпосередньо або непрямо пов'язаний з експресією або активністю 11 β -HSD1. Захворювання, пов'язане з 11 β -HSD1, може також включати будь-яке захворювання, розлад або стан, якого можна запобігти, полегшити або вилікувати модулюванням активності вказаного фермента.

Сполуки заявленої формули I здатні виступати інгібіторами фермента 11 β -HSD1.

Заявлені сполуки I та II достовірно сприяють нормалізації титрів кортизолу при модельному ішемічному інсульті, що вказує на наявність у них позитивної модулюючої дії на формування стероїдної ексайтотоксичності. Введення сполук згідно з даним винаходом знижує тільки підвищений рівень кортизолу, а його титр не відрізняється від фізіологічного навіть при курсовій терапії, що доводить відсутність дії на гормональну вісь HPA.

Приклади захворювань, пов'язаних з 11 β -HSD1, включають ожиріння, діабет, непереносимість глюкози, стійкість до інсуліну, гіперглікемію, гіпертензію, гіперліпідемію, когнітивне порушення, деменцію, інсульт, депресію (наприклад, психотичну депресію), глаукому, серцево-судинні захворювання, остеопороз і запалення. Додаткові приклади захворювань, пов'язаних з 11 β -HSD1, включають метаболічний синдром, діабет 2 типу, надлишок чоловічих статевих гормонів (гірсутизм, порушення менструального циклу, гіперандрогенізм) і синдром полікістозних яєчників (PCOS).

Термін "клітина", який застосовують в даному документі, стосується клітини, яка існує *in vitro*, *ex vivo* або *in vivo*. У деяких варіантах втілення винаходу *ex vivo* клітина може бути частиною зразка тканини, отриманого з організму, такого як ссавець. У ще інших варіантах втілення винаходу *in vitro* клітина може бути клітиною в клітинній культурі. У деяких інших

варіантах втілення винаходу *in vivo* клітина є клітиною, що знаходиться в організмі, такому як ссавець, і являє собою жирову клітину, панкреатичну клітину, гепатоцит, нейрон або клітину ока.

Як застосовано у даному документі, термін "взаємодія" стосується зближення вказаних вище агентів - сполук, ферментів, клітин тощо в *in vitro* системі або *in vivo* системі. Наприклад, "взаємодія" ферменту 11 β -HSD1 з сполукою згідно з даним винаходом включає введення вказаної сполуки індивідууму або пацієнту, такому як людина, що має 11 β -HSD1, також як, наприклад, введення цієї сполуки в зразок, що містить клітинний або очищений препарат, або фермент 11 β -HSD1.

Як застосовано у даному документі, термін "індивідуум" або "пацієнт", що є взаємозамінними, стосується будь-якої тварини, включаючи ссавців, переважно мишей, щурів, інших гризунів, кроликів, собак, кішок, свиней, рогатої худоби, овець, коней або приматів, і найбільш переважно, людей.

Як застосовано у даному документі, термін "лікувати" або "лікування" стосується одного або більше з: (1) запобігання захворюванню, наприклад, запобігання захворюванню, стану або розладу в індивідуума, який схильний до вказаних захворювання, стану або розладу, але ще не відчув або не виявив їх патологію або симптоматологію; (2) припинення захворювання; наприклад, припинення захворювання, стану або розладів в індивідуума, який відчув або виявляє патологію або симптоматологію вказаних захворювання, стану або розладів; і (3) полегшення захворювання; наприклад, полегшення захворювання, стану або розладів в індивідуума, який відчув або виявляє патологію або симптоматологію вказаних захворювання, стану або розладів (тобто реверсії патології і/або симптоматології), такому як зниження тяжкості захворювання.

При застосуванні як лікарські засоби сполуки, згідно з даним винаходом, можна вводити в формі фармацевтичних композицій, які є комбінацією сполуки згідно з даним винаходом і щонайменше одного фармацевтично прийнятного носія.

Дані композиції можна одержати способом, добре відомим в галузі фармацевтики, і можна вводити різними способами, в залежності від бажаного лікування - місцевого чи системного та від захворювання, яке потребує лікування.

Введення може бути місцевим (включаючи тканини ока, слизових оболонок, включаючи інтраназальну, вагінальну і ректальну доставку), легеневим (наприклад, інгаляцією або інсуфляцією порошків або аерозолів, включаючи аерозольний препарат; інтратекальним, інтраназальним, епідермальним і трансдермальним), пероральним або парентеральним.

Способи введення в офтальмології можуть включати: місцеве введення (краплі для очей), підкон'юнктивальний, періокулярний ін'єкційний розчин або розчин для введення в скловидне тіло, або введення балонним катетером, або введення офтальмологічних плівок, уведених у кон'юнктивальний мішок.

Парентеральне введення включає внутрішньовенну, внутрішньоартеріальну, підшкірну, внутрішньочеревинну або внутрішньом'язову ін'єкцію або інфузію; або внутрішньочерепне, наприклад, інтратекальне або інтравентрикулярне, введення. Парентеральне введення може бути у формі одиначної болюсної дози або може здійснюватися, наприклад, за допомогою безперервного перфузійного насосу.

Фармацевтичні композиції і склади для місцевого введення можуть включати трансдермальні пластирі, мазі, лосьйони, креми, гелі, краплі, супозиторії, спреї, рідини і порошки. Загальноприйняті фармацевтичні носії, водні, порошкові або масляні основи, загусники і подібні їм допоміжні речовини можуть бути необхідні і бажані.

Даний винахід також пропонує фармацевтичні композиції, які містять як активний інгредієнт одну або більше вищезгаданих сполук загальної формули I в комбінації з одним або більше фармацевтично прийнятними носіями. При одержанні композицій згідно з даним винаходом активний інгредієнт зазвичай змішують з допоміжною речовиною, розбавляють допоміжною речовиною або вміщують у відповідний носій в формі, наприклад, капсули, саше, паперової або іншої місткості. Коли допоміжна речовина є розріджувачем, то вона може бути твердою, напівтвердою або рідким матеріалом, який діє як розчинник, носій або середовище для активного інгредієнта. Таким чином, композиції можуть бути в формі таблеток, пілюль, порошків, пастилок, саше, крохмальних капсул, еліксирів, суспензій, емульсій, розчинів, сиропів, аерозолів (в твердому вигляді або в рідкому середовищі), мазей, що містять, наприклад, аж до 10 % за вагою активної сполуки, м'яких і твердих желатинових капсул, супозиторіїв, стерильних розчинів для ін'єкції і упакованих в стерильних умовах порошків.

Сполуки згідно з даним винаходом можна подрібнювати, застосовуючи відомі способи подрібнення, такі як мокре подрібнення, для одержання розміру частинок, відповідних для одержання таблеток і інших типів складів. Дрібноподрібнені (наночастинки) препарати сполук

згідно з даним винаходом можна одержати способами, відомими в даній галузі техніки, наприклад, див. міжнародну патентну заявку № WO 2002/000196.

Деякі приклади відповідних допоміжних речовин включають лактозу, декстрозу, сукрозу, сорбіт, маніт, крохмаль, аравійська камедь, фосфат кальцію, альгінати, трагакант, желатин, силікат кальцію, мікрокристалічну целюлозу, полівінілпіролідон, целюлозу, воду, сироп і метилцелюлозу. Склади можуть додатково містити змащувальні речовини, такі як тальк, стеарат магнію і мінеральне масло; зволожуючі агенти; емульгатори і суспендуючі агенти; консерванти, такі як метил- і пропілгідроксibenзоат; підсолоджувачі і ароматизуючі речовини. Композиції згідно з даним винаходом можна формулювати так, щоб забезпечити швидке, стабільне або уповільнене вивільнення активного інгредієнта після введення пацієнту застосуванням способів, відомих в даній галузі техніки.

Композиції можна формувати у вигляді одиничної дозованої лікарської форми, причому кожна доза містить від приблизно 5 до приблизно 100 мг, більш переважно від приблизно 10 до приблизно 50 мг активного інгредієнта. Термін "одиничні дозовані лікарські форми" стосується фізично дискретних одиничних форм, придатних як одиничні дози для людини і інших ссавців, причому кожна одинична форма містить попередньо визначену кількість активного матеріалу, обчислену для того, щоб надати необхідну терапевтичну дію спільно з відповідною фармацевтичною допоміжною речовиною.

Активна сполука може бути ефективною в широкому діапазоні доз, і її звичайно вводять у фармацевтично ефективній кількості. Проте, загальновідомо, що терапевтично ефективна кількість сполуки може коригуватись лікуючим лікарем з урахуванням супутніх обставин, які включають стан, який потребує лікування, шлях введення терапевтичного агента, конкретну сполуку, що вводиться, вік, вагу і реакцію конкретного пацієнта, тяжкість симптомів у пацієнта і подібні.

Для одержання твердих композицій, таких як таблетки, основний активний інгредієнт змішують з фармацевтичною допоміжною речовиною для одержання твердої попередньої композиції, що містить гомогенну суміш сполуки згідно з даним винаходом. При згадці даних попередніх композицій як гомогенних активний інгредієнт звичайно рівномірно розподіляють в композиції так, щоб композицію можна було легко розділяти на рівні ефективні одиничні лікарські форми, такі як таблетки, пілюлі і капсули. Потім дані тверді попередні склади розділяють на одиничні лікарські форми описаного вище типу, що містять від, наприклад, 0,1 до приблизно 500 мг активного інгредієнта згідно з даним винаходом. Таблетки або пілюлі згідно з даним винаходом можна покривати або в інших випадках змішувати для одержання лікарської форми, одержуючи ефект тривалої дії. Наприклад, таблетка або пілюля може містити внутрішню дозову і зовнішню дозову компоненту, причому остання являє собою покриття першої. Два компоненти можна розділити ентросолюбільним шаром, який служить для опору розпаду в шлунку і дозволяє внутрішньому компоненту пройти непошкодженим в дванадцятипалу кишку або служить для сповільнення вивільнення. Можна застосовувати множинну матеріалів для даних ентросолюбільних шарів або покриттів, і дані матеріали включають ряд полімерних кислот і суміші полімерних кислот з такими матеріалами, як шелак, цетиловий спирт і та похідні целюлози, зокрема гідроксипропілметилцелюлоза або етилцелюлоза тощо.

Рідкі форми, в які можна вводити сполуки і композиції згідно з даним винаходом для перорального введення або введення за допомогою ін'єкції, включають водні розчини, відповідні ароматизовані сиропи, водні або масляні суспензії і ароматизовані емульсії з харчовими оліями, такими як бавовняна олія, кунжутна олія, кокосова олія або арахісова олія, також як еліксири і аналогічні фармацевтичні розчинники.

Композиції для інгаляції або інсуфляції включають розчини і суспензії в фармацевтично прийнятних водних або органічних розчинниках, або їх сумішах, і порошки. Рідкі або тверді композиції можуть містити відповідні фармацевтично прийнятні допоміжні речовини, як описано вище. У деяких варіантах здійснення композиції вводять пероральним або назальним респіраторним шляхом для місцевої або загальної дії. Композиції можна розпилювати застосуванням інертних газів. Розчини, що розпилюються, можна вдихати безпосередньо з розпилюючого пристрою або розпилюючий пристрій можна приєднувати до масок для обличчя або пристрою для дихання з позитивним тиском, що переважається.

Композиції у вигляді розчину, суспензії або порошку можна вводити перорально або назально за допомогою пристрою, який відповідним способом доставляє вказану композицію.

Кількість сполуки або композиції, що вводиться пацієнту, буде залежати від того, в якій формі вводять сполуку або композицію, мети введення, такої як профілактика або лікування, стану пацієнта, способу введення тощо. З терапевтичною метою композиції можна вводити

пацієнту, вже страждаючому від захворювання, в кількості, достатній для того, щоб вилікувати або щонайменше частково зупинити симптоми захворювання і його ускладнення. Ефективні дози будуть залежати від стану захворювання, який треба лікувати, а також від тяжкості захворювання, віку, ваги і загального стану здоров'я пацієнта тощо.

5 Композиції, що вводяться пацієнту, можуть бути в формі фармацевтичних композицій, описаних вище. Дані композиції можна стерилізувати загальноприйнятими способами стерилізації або їх можна стерилізувати стерилізуючою фільтрацією.

10 Водні розчини можна упаковувати для застосування, як є, або ліофілізувати, причому ліофілізований препарат змішують зі стерильним водним носієм перед введенням. рН таких препаратів зазвичай буде складати від 3 до 11, більш переважно від 5 до 9 і найбільш переважно від 7 до 8. Ясно, що застосування визначених 40 речовин з вищезгаданих допоміжних речовин, носіїв або стабілізаторів буде приводити до утворення фармацевтичних солей.

15 Терапевтичні дози сполук згідно з даним винаходом можуть змінюватися в залежності, наприклад, від конкретного застосування, для якого проводиться лікування, способу введення сполуки, здоров'я і стану пацієнта і рішення лікуючого лікаря. Кількісне співвідношення або концентрація сполуки згідно з даним винаходом в фармацевтичній композиції може змінюватися в залежності від ряду факторів, включаючи дозу, хімічні характеристики (наприклад, гідрофобність) і спосіб введення. Наприклад, сполуки згідно з даним винаходом можна
20 одержувати у вигляді водного фізіологічного буферного розчину, що містить від приблизно 0,1 до приблизно 10 % ваг./об. сполуки для парентерального введення. Деякі діапазони стандартних доз складають від приблизно 1 мкг/кг до приблизно 1 г/кг ваги тіла на день. У деяких варіантах діапазон доз складає від приблизно 0,01 мг/кг до приблизно 100 мг/кг ваги тіла на день. Доза, ймовірно, залежить від таких змінних, як тип і міра прогресування захворювання або розладу, загального статусу здоров'я конкретного пацієнта, відносної біологічної активності
25 вибраної сполуки, складу допоміжної речовини і шляху її введення. Ефективні дози можна екстраполювати, виходячи з кривих доза-ефект, одержаних в системах для випробувань *in vitro* або на модельних тваринах.

30 Сполуки згідно з даним винаходом можна також застосовувати у комбінації з одним або більше додаткових активних фармацевтичних інгредієнтів, які можуть включати будь-який фармацевтичний агент, такий як противірусні агенти, вакцини, антибіотики, агенти, що посилюють імунітет, імуносупресори, протизапальні агенти, анальгетики і лікарські засоби для лікування інсульту, інфаркту, діабету та ожиріння, гіперглікемії, гіпертензії, гіперліпідемії і подібних. Агенти для лікування метаболічних розладів, з якими сполуки згідно з даним
35 винаходом можна змішувати, включають, але не обмежуються, амілінові аналоги, інкретинові міметики, інгібітори дипептидилпептидази-IV, що є ферментом, який руйнує інкретин, агоністи рецептора, що активується проліфератором пероксисом (PPAR)-а і PPAR- γ , і інгібітори CB1 канабіноїдного рецептора.

40 Даний винахід буде описаний більш детально за допомогою конкретних прикладів. Наступні приклади представлені з ілюстративною метою, і не передбачається, що вони обмежують даний винахід будь-яким способом. Фахівцям зрозуміло, що множини некритичних параметрів, які можна змінити або модифікувати, будуть давати, по суті, ті ж самі результати.

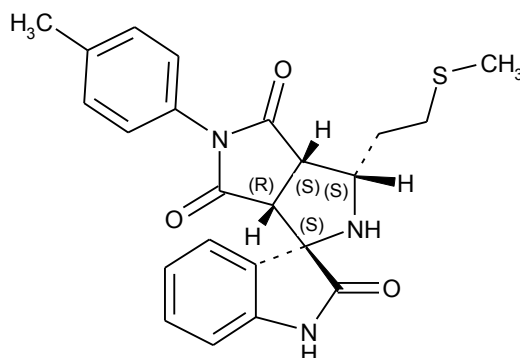
Приклади

45 Всі сполуки очищали або колонковою флеш-хроматографією або зворотно-фазовою рідинною хроматографією, застосовуючи Waters FractionLynx LC-MS систему з фракціонуванням по масі. Column: Waters XBridge C18 5 мкм, 19×100 мм; рухома фаза А: 0,15 % NH₄OH у воді і рухома фаза В: 0,15 % NH₄OH в ацетонітрилі; швидкість потоку була 30 мл/хв., розділяючий градієнт підбирали для кожної сполуки, застосовуючи Compound Specific 15 Method Optimization protocol, як описано в літературі ["Preparative LC-MS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization", K. Blom, B. Glass, R. Sparks, A. Combs, J. Combi. Chem.,
50 2004, 6, 874-883].

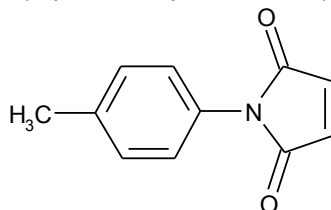
Потім виділений продукт звичайно піддавали аналітичній LC/MS для перевірки чистоти при наступних умовах: Instrument; Agilent 1100 series, LC/MSD, колонка: Waters Sunfire™ C18 5 мкм, 20 2,1×5,0 мм, буфери: рухома фаза А: 0,025 % TFA у воді і рухома фаза В: 0,025 % TFA в ацетонітрилі; градієнт 2-80 % буфера В протягом 3 хвилин при швидкості потоку 1,5 мл/хв.
55

Приклад 1

5'-(4-Метилфеніл)-3'-[2-(метилтіо)етил]-3а',6а'-дигідро-2'H-спіро[індол-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-2,4',6'-(1H, 3'H, 5'H)тріон (SI-86)



Стадія 1: 1-р-Толіл-пірол-2,5-діон (1-р-толіл-пірол-2,5-діон)



Малеїновий ангідрид (98,1 г, 1,0 моль) і р-толуїдину (137,1 г, 1,0 моль) розчиняли у N, N,-
 5 диметилформаміді (ДМФ, 320 мл), потім суміш перемішували при кімнатній температурі
 протягом 5 год. в атмосфері азоту. Отриманий розчин виливають у велику кількість води, щоб
 осадити сиру п-толілмалеамінову кислоту (N-(4-метилфеніл)малеамінову кислоту, р-ТМА). Сиру
 р-толілмалеамінову кислоту відфільтровували, сушили, а потім тричі перекристалізовували з
 суміші води з одержанням чистого продукту (97 %), Т.пл. 160-162 °С

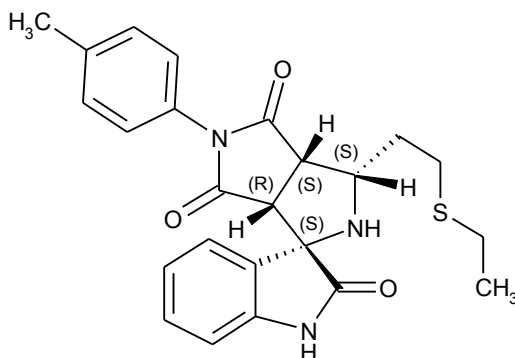
Суміш р-ТМА (43,5 г, 0,2 моль), оцтового ангідриду (100 мл) і (2,5 г) ацетату натрію
 10 перемішували при 55-60 °С протягом 2 годин. Реакційну суміш виливають у велику кількість
 води та льоду з одержанням неочищеного 1-р-толіл-пірол-2,5-діону у вигляді маслоподібного
 осаду, який застигає у аморфну масу при перемішуванні. Після чого осад декантують, а сирий
 1-р-толіл-пірол-2,5-діон розчиняють у мінімальній кількості етанолу, залишають при 0-+10 °С до
 15 випадіння осаду, який відфільтровували, промивали водою, сушили і перекристалізовували три
 рази з етанолу. Вихід 85 %. Т_{пл} = 144-146 °С. Жовтий кристалічний порошок. LC/MS m/e 188
 (M+H)⁺. ЯМР ¹H, δ, м. ч. (TMS, DMSO-d₆): 8.03-7.49 (2d, J=8.24 Hz, 4H, Ph); 7.22 (s, 2H, -CO-
 CH=CH-CO-), 2.33 (3H, s, PhCH₃). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 21.1, 126.0, 128.5, 129.8, 134.2, 138.1,
 169.7. IR (CHCl₃, cm⁻¹) 1708, 1390.

Стадія 2: 5'-(4-Метилфеніл)-3'-[2-(метилтіо)етил]-3a',6a'-дигідро-2'H-спіро[індол-3,1'-
 піроло[3,4-с]пірол]-2,4',6'-(1H, 3'H, 5'H)тріон (SI-86)

Суміш (1 моль, 147 г) ізатину, (1 моль, 147 г) L-метіоніну (≥ 99.0 % (NT) (Fluka) і (1 моль, 187
 г) 1-р-толіл-пірол-2,5-діону, у 40 мл суміші пропан-2-ол: вода (3:1) кип'ятять протягом 2,5-3
 25 годин, проходження реакції контролюють по ТШХ і зміні забарвлення реакційної суміші (від
 червоного до блідо-жовтого). Розчин охолоджують, осад, що випав фільтрують, промивають
 пропан-2-олом і кристалізують з н-бутанолу з розрахунку 70 мл на 1 г. Вихід 366 г, 87 %. Білий
 кристалічний порошок, Т. пл. 184-186 °С (n-BuOH), максимум поглинання λ_{max} 225 нм (lgε ~
 3,703) у метанолі. LC/MS m/e 421 (M+H)⁺. ЯМР ¹H, δ, м.д (TMS, DMSO-D₆): 10.39 (1H, s, 1H, NH),
 7.26-7.38 (2H, m, Ar), 7.11-7.23 (3H, m, Ar), 6.74-7.02 (3H, m, Ar), 4.26 (1H, t, J=7 Hz, 3'-CH), 3.85
 30 (1H, d, J=7 Hz, 2'-NH), 3.61 (1H, t, J=8 Hz, 3a'-CH), 3.41 (1H, d, J=8 Hz, 6a'-CH), 3.27-3.33 (2H, m,
 CH₂CH₂SCH₃), 2.54-2.68 (2H, m, CH₂CH₂SCH₃), 2.34 (3H, s, PhCH₃), 1.94-2.17 (3H, m,
 CH₂CH₂SCH₃), 1.72 (1H, dd, J=14 and 7 Hz). Знайдено, %: C - 65,53; H-5,50; N-9,95; S-7,62.
 C₂₃H₂₃N₃O₃S. Обчислено, %: C - 65,54; H-5,50; N-9,97; S-7,61.

Приклад 2

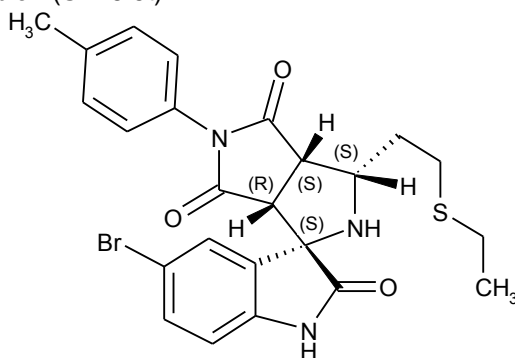
5'-(4-Метилфеніл)-3'-[2-(етилтіо)етил]-3a',6a'-дигідро-2'H-спіро[індол-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-
 2,4',6'-(1H, 3H',5H')тріон (SI-34).



Дану сполуку одержували, застосовуючи методики, які були аналогічні методикам, описаним для синтезу прикладу 1, стадії 1 і 2, а замість L-метіоніну використовували L-етіонін. Вихід 88 %. Білий кристалічний порошок, Т.пл. 209-210 °C (з розкладанням, n-BuOH), максимум поглинання λ_{max} 291 нм ($\lg \epsilon \sim 0,618$) у метанолі. LC/MS m/e 435 (M+H)⁺. ЯМР ¹H, δ , м.д (TMS, DMSO-D₆): 10.39 (1H, s, 1H, NH), 7.18 (4-Ar, 1H, t; J=7.6) 6.98 (4-Ar, 1H, д J=7.9 Hz), 6.88 (5-Ar, 1H, t J=7.9), 6.80 (7-Ar, 1H, д J=7.9), 4.31-4.24 (3'-CH, 1H, м,), 3.86 (1H, d, J=6.7 Hz, 2'-NH), 3.62 (3'a-CH 1H, t J=7.6), 3.41 (1H, d, J=8 Hz, 6a'-CH), 2.13-2.04; 1.78-1.69 (2H, м, 3'-CHaHb-CH₂S), 2.72-2.62 (2H, м, 3'-CHaHb-CH₂S), 2.54-2.50 (3'-SCH₂Me, 2H, м), (3'-SCH₂Me J=7.3), 2.35 (3H, s, PhCH₃), 1.18 (3H, д 3'-SCH₂Me t J=7.3). Знайдено, %: C - 66.20; H - 5.79; N-9.67; S-7.37. C₂₄H₂₅N₃O₃S. Обчислено, %: C - 66.18; H - 5.79; N-9.65; S-7.36.

Приклад 3

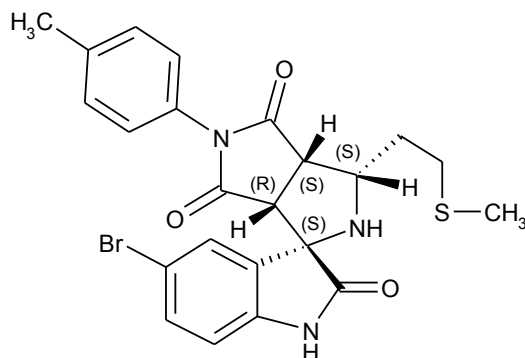
5-Бром-5'-(4-метилфеніл)-3'-[2-(етилтіо)етил]-3a',6a'-дигідро-2'H-спіро[індол-3,1'-піроло[3,4-c]пірол]-2,4',6'-(1H, 3'H, 5'H)тріон (SI-76 5t).



Дану сполуку одержували, застосовуючи методики, які були аналогічні методикам, описаним для синтезу прикладу 1, стадії 1 і 2, а замість L-метіоніну та ізатину використовували L-етіонін та 5-бромізатин відповідно. Вихід 90 %. Кремовий кристалічний порошок, Т.пл. 243-245 °C (n-BuOH). LC/MS m/e 514 (M+H)⁺. Спектр ЯМР ¹H, δ , м.д (J, Гц): 1.17 (т, 3H, CH₂CH₂SCH₂CH₃, J=7.5), 1.66-2.12 (м, 2H, CH₂CH₂SCH₂CH₃), 2.34 (с, 3H, PhCH₃), 2.50-2.73 (м, 4H, CH₂CH₂SCH₂CH₃), 3.46 (д, 1H, 6a'-CH, J=7.7), 3.64 (т, 1H, 3a'-CH, J=7.7), 3.98 (д, 1H, 2'-NH, J=7.0), 4.12-4.23 (м, 1H, 3'-CH), 6.76 (д, 1H, 7-CH, J=8.4), 7.12 (д, 1H, 4-CH, J=1.5), 7.17 (д, 2,6-CH (PhMe), J=8.1), 7.31 (д, 2H, 3,5-CH (PhMe), J=8.1), 7.37 (дд, 1H, 6-CH, J_{мета}=1.5, J_{орто}=8.4), 10.57 (с, 1H, NH). ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ : 180.1, 176.0, 174.6, 142.0, 138.5, 132.3, 130.4, 130.3, 129.9, 129.5, 127.2, 113.2, 111.8, 68.8, 58.1, 53.2, 49.3, 40.6, 40.5, 40.4, 40.3, 40.3, 40.2, 40.1, 40.0, 39.9, 39.8, 39.7, 39.5, 31.8, 29.1, 25.4, 21.2, 15.3. Знайдено, %: C - 56.02; H - 4.69; N-8.16; S-6.22. C₂₄H₂₄BrN₃O₃S. Обчислено, %: C - 56.03; H - 4.70; N-8.17; S-6.23.

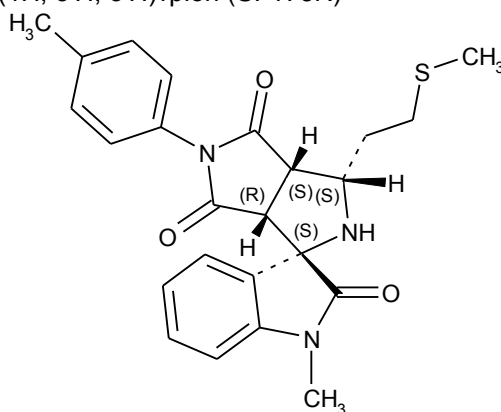
Приклад 4

5-Бром-5'-(4-метилфеніл)-3'-[2-(метилтіо)етил]-3a',6a'-дигідро-2'H-спіро[індол-3,1'-піроло[3,4-c]пірол]-2,4',6'-(1H, 3'H, 5'H)тріон (SI-87 6v)



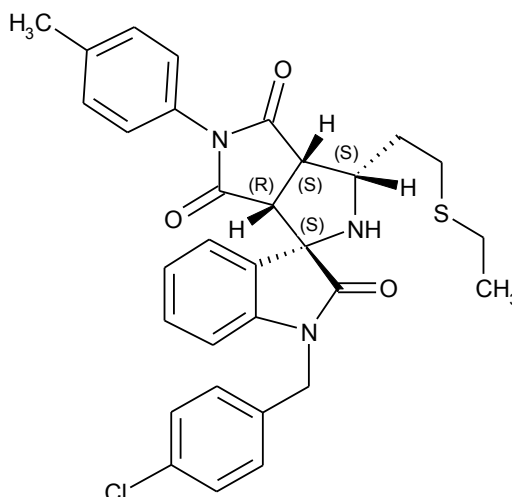
Дану сполуку одержували, застосовуючи методики, які були аналогічні методикам, описаним для синтезу прикладу 1, стадії 1 та 2, а замість ізатину використовували 5-бромізатин відповідно. Вихід 90 %. Кремовий кристалічний порошок, Т.пл. 242-244 °C (n-BuOH). LC/MS m/e 500 (M+H)⁺. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ: 10.56 (с, 1H, NH), 7.42-7.08 (м, 6H, Ar) 6.83-6.73 (м, 1H, Ar), 4.33-4.16 (м, 1H, NH), 3.93-3.83 (м, 1H, CH), 3.65-3.46 (м, 2H, CH), 2.34 (с, 3H, CH₃), 1.25 (д, 3H, CH₃). Знайдено, %: C - 55.23; H - 4.50; N-8.40. C₂₃H₂₂BrN₃O₃S, %. Обчислено, %: C - 55.20; H - 4.43; N-8.40.

Приклад 5: 1-Метил-5'-(4-Метилфеніл)-3'-[2-(метилтіо)етил]-3a',6a'-дигідро-2'H-спіро[індол-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-2,4',6'-(1H, 3'H, 5'H)тріон (SI-176N)



Дану сполуку одержували, застосовуючи методики, які були аналогічні методикам, описаним для синтезу прикладу 1, стадії 1 та 2, а замість ізатину використовували 1-метил-ізатин відповідно. Вихід 95 %. Білий кристалічний порошок, Т.пл. 257-259 °C (n-BuOH). LC/MS m/e 435 (M+H)⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ 7.33 (d, J=7.9 Hz, 3H), 7.22 (d, J=8.3 Hz, 2H), 6.91-7.08 (м, 3H), 4.31 (br. s., 1H), 3.84-3.95 (м, 1H), 3.66 (t, J=7.5 Hz, 1H), 3.45 (d, J=7.9 Hz, 1H), 3.32 (br. s., 2H), 3.13 (s, 3H), 2.58-2.73 (м, 2H), 2.51 (br. s., 1H), 2.37 (br. s., 3H), 2.01-2.13 (м, 4H), 1.69-1.83 (м, 1H). Знайдено, %: C - 66,19; H-5,80; N-9,66; S-7,37. C₂₄H₂₅N₃O₃S. Обчислено, %: C - 66,18; H-5,79; N-9,65; S-7,36.

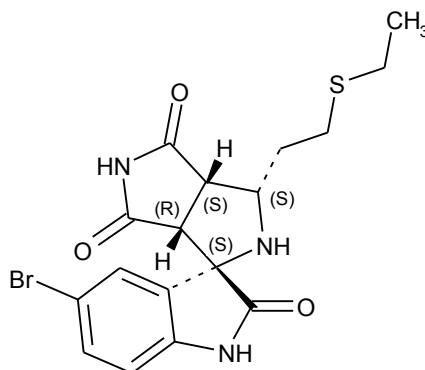
Приклад 6
1-(4-Хлорбензил)-3'-[2-(етилтіо)етил]-5'-(4-метилфеніл)-3a',6a'-дигідро-2'H-спіро[індол-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-2,4',6'-(1H, 3'H, 5'H)тріон (SI-108 6x).



Дану сполуку одержували, застосовуючи методики, які були аналогічні методикам, описаним для синтезу прикладу 1, стадії 1 та 2, а замість L-метіоніну та ізатину використовували L-етіонін та 1-хлорбензил-ізатин відповідно. Вихід: 63 %. Білий аморфний порошок з Т.пл. 158-160 °C (n-BuOH). LC/MS m/e 559 (M+H)⁺. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ 7.44-6.83 (m, 12H, Ar), 4.85 (d, 2H, CH₂), 4.42-4.23 (m, 1H, NH), 3.98 (d, 1H, CH), 3.76-3.60 (m, 2H, CH), 3.50 (d, 3H, CH, CH₂), 2.74-2.53 (d, 2H, CH₂), 2.34 (s, 3H, CH₃), 2.16-1.64 (m, 4H, CH₂), 1.17 (t, 3H, CH₃). Обчислено, %: C - 66.48; H - 5.40; N-7.50. C₃₁H₃₀ClN₃O₃S. Знайдено, %: C - 66.50; H - 5.43; N-7.49.

Приклад 7

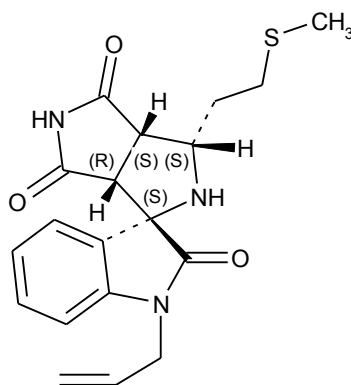
5-Бром-3'-[2-(етилтіо)етил]-3a',6a'-дигідро-2'H-спіро[індоло-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-2,4',6'-(1H, 3'H, 5'H)тріон (SI-81 7c)



Дану сполуку одержували, застосовуючи методики, які були аналогічні методикам, описаним для синтезу прикладу 1, стадії 1 та 2, а замість 1-р-толіл-пірол-2,5-діону L-метіоніну та ізатину використовували пірол-2,5-діон, L-етіонін та 5-бром-ізатин відповідно. Вихід: 75 %. Білий кристалічний порошок з Т.пл. 228-230 °C (n-BuOH). LC/MS m/e 424 (M+H)⁺. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ: 1.17 (т, J=7.32 Hz, 4H) 1.47-1.71 (м, 1H) 1.88-2.11 (м, 1H) 2.34-2.72 (м, 7H) 3.24 (д, J=7.69 Hz, 3H) 3.38-3.53 (м, 1H) 3.86 (д, J=5.86 Hz, 1H) 4.03-4.21 (м, 1H) 6.74 (д, J=8.42 Hz, 1H) 7.04 (с, 1H) 7.37 (д, J=8.06 Hz, 1H) 10.49 (с, 1H) 11.39 (с, 1H). ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 180.3, 178.3, 176.8, 141.9, 132.1, 130.6, 129.3, 113.2, 111.6, 68.1, 57.3, 53.9, 49.8, 40.5, 40.3, 40.2, 40.0, 39.8, 39.7, 39.5, 32.0, 29.0, 25.4, 15.3. Обчислено, %: C, 48.12; H, 4.28; N, 9.90. C₁₇H₁₈BrN₃O₃S. Знайдено, %: C - 48.15; H - 4.30; N-9.95.

Приклад 8

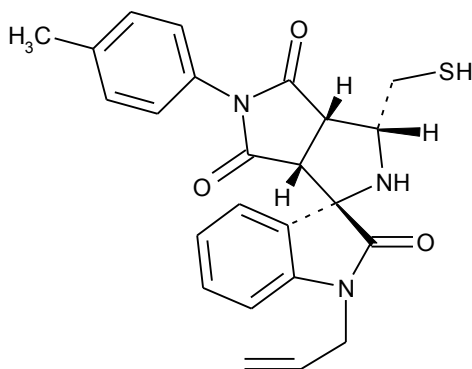
1-Аліл-3'-[2-(метилтіо)етил]-3a',6a'-дигідро-2'H-спіро[індол-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-2,4',6'-(1H, 3'H, 5'H)тріон (SI-149 7d)



Дану сполуку одержували, застосовуючи методики, які були аналогічні методикам, описаним для синтезу прикладу 1, стадії 1 та 2, а замість 1-р-толіл-пірол-2,5-діону та ізатину використовували пірол-2,5-діон, та 1-аліл-ізатин відповідно. Вихід: 75 %. Білий кристалічний порошок з Т.пл. 300 °C (з розкладанням, n-BuOH). LC/MS m/e 371 (M+H)⁺. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ 1.18 (д, J=6.59 Hz, 4H) 3.10-3.27 (м, 2H) 3.35-3.46 (м, 2H) 3.70 (д, J=5.49 Hz, 1H) 4.11-4.35 (м, 3H) 5.00-5.28 (м, 2H) 5.68-5.94 (м, 1H) 6.81-7.10 (м, 3H) 7.25 (д, J=7.32, 1.83 Hz, 1H) 11.29 (уш. с, 1H). Обчислено, %: C - 61.44; H - 5.70; N-11.31. C₁₉H₂₁N₃O₃S. Знайдено, %: C - 61.48; H - 5.77; N-11.36.

Приклад 9

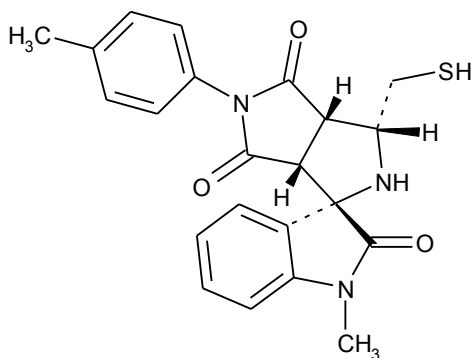
1-Аліл-3'-(меркаптометилен)-3а',6а'-дигідро-2'Н-спіро[індол-3,1'-піроло[3,4-пірол]-2,4',6'-(1H, 3'Н, 5'Н)тріон (SI-123)



Дану сполуку одержували, застосовуючи методики, які були аналогічні методикам, описаним для синтезу прикладу 1, стадії 1 та 2, а замість L-метіоніну та ізатину використовували L-цистеїн гідрохлорид та 1-аліл-ізатин відповідно, витримуючи реакційну суміш за температури не вище 80-90 °C. Реакційну суміш фільтрували, концентрували під вакуумом і залишок очищували флеш-хроматографією на колонці з силікагелем (елюючи сумішшю етилацетат: гексан (1:1)) для того, щоб одержати необхідний продукт. Вихід: 52 %. Злегка жовтуватий кристалічний порошок з Т.пл. 158 °C (з розкладанням, n-BuOH). LC/MS m/e 371 (M+H)⁺. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ 1.03 (уш. с, 11H), 2.33 (уш. с, 12H), 4.07-4.60 (м, 9H), 5.10-5.34 (м, 4H), 5.80 (уш. с, 2H), 6.86-7.03 (м, 4H), 7.11 (м, J=7.32 Hz, 5H) 7.28 (м., 3H). Обчислено, %: C - 66,49; H - 5,35; N-9,69; S-7,40. C₂₄H₂₃N₃O₃S. Знайдено, %: C - 66,47; H - 5,36; N-9,70; S-7,42.

Приклад 10

1-Метил-3'-(меркаптометилен)-3а',6а'-дигідро-2'Н-спіро[індол-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-2,4',6'-(1H, 3'Н, 5'Н)тріон (SI-124)

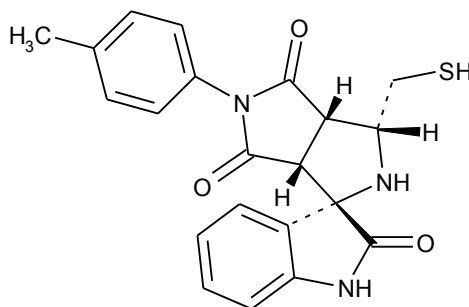


. R-124

Дану сполуку одержували, застосовуючи методики, які були аналогічні методикам, описаним для синтезу прикладу 1, стадії 1 та 2, а замість L-метіоніну та ізатину використовували L-цистеїн гідрохлорид та 1-метил-ізатин відповідно, витримуючи реакційну суміш за температури не вище 80-90 °С. Реакційну суміш фільтрували, концентрували під вакуумом і залишок очищували флеш-хроматографією на колонці з силікагелем (елюючи сумішшю етилацетат:гексан (1:1)) для того, щоб одержати необхідний продукт. Вихід: 45 %. Злегка жовтуватий кристалічний порошок з Т.пл. 167-169 °С (з розкладанням, n-BuOH). LC/MS m/e 407. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ: 1.05 (д, J=5.86 Hz, 2H) 2.36 (уш. с, 4H) 2.51 (м., 4H) 3.14 (уш. с, 3H) 3.78 (уш. с, 2H) 4.18 (уш. с, 2H) 4.56 (уш. с, 2H) 7.15 (уш. с, 3H) 7.30 (д, J=7.69 Hz, 5H). Обчислено, %: C - 64,85; H - 5,19; N-10,31; S-7,87. C₂₂H₂₁N₃O₃S. Знайдено, %: C - 64,86; H - 5,20; N-10,32; S-7,88.

Приклад 11

3'-(Меркаптометил)-3a',6a'-дигідро-2'H-спіро[індол-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-2,4',6'-(1H, 3'H, 5'H)тріон (SI-121)

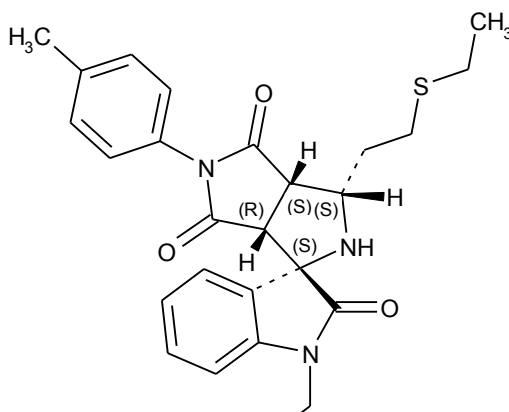


R-121

Дану сполуку одержували, застосовуючи методики, які були аналогічні методикам, описаним для синтезу прикладу 1, стадії 1 та 2, а замість L-метіоніну використовували L-цистеїн гідрохлорид, витримуючи реакційну суміш за температури не вище 80-90 °С. Реакційну суміш фільтрували, концентрували під вакуумом і залишок очищували флеш-хроматографією на колонці з силікагелем (елюючи сумішшю етилацетат: гексан (1:1)) для того, щоб одержати необхідний продукт. Вихід: 43 %. Злегка жовтуватий кристалічний порошок з Т.пл. 178 °С (з розкладанням, n-BuOH). LC/MS m/e 393. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆, TMS): 2.33 (с, 3H) 3.26 (уш с, 3H) 3.67-3.87 (м, 1H) 4.07-4.24 (м, 1H) 4.51 (д, J=5.04 Hz, 1H) 6.74-6.99 (м, 1H) 6.99-7.39 (м, 8H) 10.55 (уш. с, 1H). Обчислено, %: C - 64,10; H - 4,87; N-10,68; S-8,15. C₂₁H₁₉N₃O₃S. Знайдено, %: C - 64,08; H - 4,88; N-10,69; S-8,14.

Приклад 12

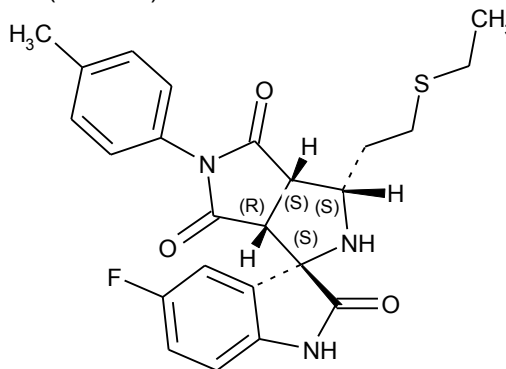
1-Аліл-3'-[2-(етилтіо)етил]-5'-(4-метилфеніл)-3a',6a'-дигідро-2'H-спіро[індол-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-2,4',6'-(1H, 3'H, 5'H)тріон (SI-175)



Дану сполуку одержували, застосовуючи методики, які були аналогічні методикам, описаним для синтезу прикладу 1, стадії 1 та 2, а замість L-метіоніну та ізатину використовували, L-етіонін та 1-аліл-ізатин відповідно. Вихід: 85 %. Білий кристалічний порошок з Т.пл. 275-277 °C (з розкладанням, n-BuOH). LC/MS m/e 475 (M+H)⁺. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆, TMS): 7.08-7.37 (5H, m), 6.86-7.06 (3H, m), 5.73-5.94 (1H, m), 5.10-5.30 (2H, m), 4.27 (3H, br. s.), 3.93 (1H, d, J=7 Hz), 3.57-3.72 (1H, m, M07), 3.41 (1H, d, J=8 Hz), 2.56-2.73 (2H, m), 2.34 (3H, s), 1.96-2.17 (2H, m), 1.61-1.82 (1H, m), 1.09-1.23 (3H, m). Обчислено, %: C - 68,18; H-6,15; N-8,84; S-6,74. C₂₇H₂₉N₃O₃S. Знайдено, %: C - 68,19; H-6,17; N-8,85; S-6,74.

Приклад 13:

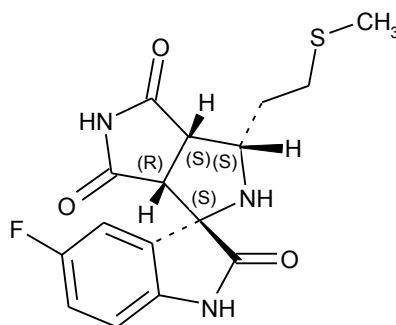
5-Фтор-3'-[2-(етилтіо)етил]-5'-(4-метилфеніл)-3а',6а'-дигідро-2'Н-спіро[індоло-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-2,4',6'-(1H, 3'H, 5'H)тріон (SI-180F)



Дану сполуку одержували, застосовуючи методики, які були аналогічні методикам, описаним для синтезу прикладу 1, стадії 1 та 2, а замість L-метіоніну та ізатину використовували, L-етіонін та 5-фтор-1H-індол-2,3-діон відповідно. Вихід: 85 %. Білий кристалічний порошок з Т.пл. 285-287 °C (з розкладанням, n-BuOH). LC/MS m/e 453 (M+H)⁺. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ: 10.46 (1H, s, NH), 6.90-7.38 (6H, m, Ar), 6.70-6.90 (2H, m, Ar), 4.24 (1H, t, J=7 Hz, 1H, 3'-CH), 3.94 (1H, d, J=7 Hz, 2'-NH), 3.62 (1H, t, J=8 Hz, 3a'-CH), 3.45 (1H, d, J=8 Hz, 6a'-CH), 2.55-2.72 (2H, m, CH₂CH₂SCH₂CH₃), 2.27-2.39 (4H, m, PhCH₃+CH₂CH₂SCH₂CH₃), 2.06 (1H, dq, J=14 та 7 Hz,), 1.57-1.80 (1H, c, CH₂CH₂SCH₂CH₃), 1.09-1.23 (3H, d, CH₂CH₂SCH₂CH₃). ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 180.5, 135.1, 129.9, 129.8, 127.3, 127.1, 69.0, 57.9, 53.1, 49.1, 40.6, 40.5, 40.4, 40.3, 40.3, 40.2, 40.1, 40.0, 39.9, 39.8, 39.7, 39.5, 31.9, 29.1, 25.4, 21.2, 15.3 Обчислено, %: C - 63,56; H-5,33; N-9,27; S-7,07. C₂₄H₂₄FN₃O₃S. Знайдено, %: C - 63,55; H-5,34; N-9,26; S-7,06.

Приклад 14

5-Фтор-3'-[2-(етилтіо)етил]-3а',6а'-дигідро-2'Н-спіро[індоло-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-2,4',6'-(1H, 3'H, 5'H)тріон (SI-183F)

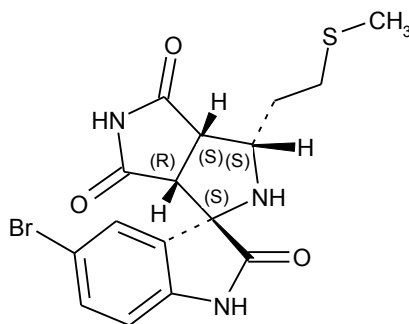


Дану сполуку одержували, застосовуючи методики, які були аналогічні методикам, описаним для синтезу прикладу 1, стадії 1 та 2, а замість 1-р-толіл-пірол-2,5-діону L-метіоніну та ізатину використовували, пірол-2,5-діон, L-етіонін та 5-фтор-1H-індол-2,3-діон відповідно. Вихід: 80 %.

- 5 Білий кристалічний порошок з Т.пл. 285-287 °C (з розкладанням, n-BuOH). LC/MS m/e 363 (M+H)⁺. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆, TMS): 11.34 (1H, br. s., NH), 10.37 (1H, s, NH), 7.03 (1H, td, J=9 and 3 Hz, F-CH-), 6.67-6.83 (2H, m, Ar), 4.33 (1H, br. s., 3'-CH), 4.04-4.20 (1H, m, 2'-NH), 3.67-3.90 (2H, m, 3a'-CH), 3.37-3.49 (3H, m, 6a'-CH), 2.52-2.67 (3H, m, CH₂CH₂SCH₂CH₃), 2.31-2.43 (1H, m), 1.98 (1H, dd, J=14 and 7 Hz, CH₂CH₂SCH₂CH₃), 1.64 (1H, dt, J=14 and 7 Hz, CH₂CH₂SCH₂CH₃), 1.26 (3H, s, CH₂CH₂SCH₂CH₃). Обчислено, %: C, 56,19; H, 4,99; N, 11,56; S, 8,82. C₁₇H₁₈FN₃O₃S. Знайдено, %: C - 63,55; H - 5,34; N-9,26; S-7,06.

Приклад 15:

5-Бром-3'-[2-(метилтіо)етил]-3a',6a'-дигідро-2'H-спіро[індоло-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-2,4',6'-(1H, 3'H, 5'H)тріон (SI-173N)



15

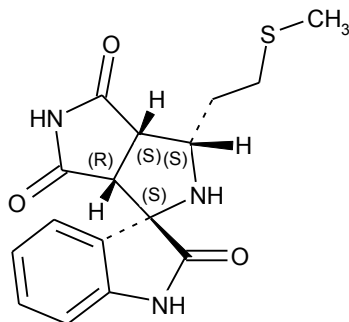
Дану сполуку одержували, застосовуючи методики, які були аналогічні методикам, описаним для синтезу прикладу 1, стадії 1 та 2, а замість 1-р-толіл-пірол-2,5-діону та ізатину використовували пірол-2,5-діон та 5-бром-ізатин відповідно. Вихід: 75 %. Білий кристалічний порошок з Т.пл. 225-226 °C (n-BuOH). LC/MS m/e 410 (M+H)⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ: 11.40 (br. s., 1H), 10.50 (br. s., 1H), 7.40 (d, J=8.3 Hz, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.77 (d, J=7.9 Hz, 1H), 4.15 (br. s., 1H), 3.87 (br. s., 1H), 3.44 (t, J=7.7 Hz, 1H), 3.21-3.32 (m, 2H), 2.50-2.66 (m, 3H), 2.01-2.14 (m, 4H), 1.58-1.75 (m, 1H), 1.05 (d, J=6.2 Hz, 1H). Обчислено, %: C, 46,84; H, 3,93; N, 10,24; S, 7,82. C₁₆H₁₆BrN₃O₃S. Знайдено, %: C - 46,85; H-3,95; N-10,25; S-7,83.

20

Приклад 16:

3'-[2-(Метилтіо)етил]-3a'',6a'-дигідро-2'H-спіро[індоло-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-2,4',6'-(1H, 3'H, 5'H)тріон (SI-148N)

25



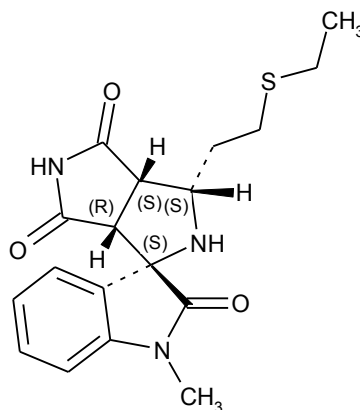
Дану сполуку одержували, застосовуючи методики, які були аналогічні методикам, описаним для синтезу прикладу 1, стадії 1 та 2, а замість 1-р-толіл-пірол-2,5-діону використовували пірол-2,5-діон. Вихід: 89 %. Білий кристалічний порошок з Т.пл. 234-236 °C (i-PrOH). LC/MS m/e 331

30

(M+H)⁺. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ: 11.32 (br. s., 1H), 10.33 (s, 1H), 7.20 (t, J=7.5 Hz, 1H), 6.96 (d, J=7.3 Hz, 1H), 6.90 (t, J=7.5 Hz, 1H), 6.79 (d, J=7.8 Hz, 1H), 4.35 (br. s., 1H), 4.14-4.22 (m, 1H), 3.70-3.83 (m, 2H), 3.44 (t, J=7.5 Hz, 1H), 3.23 (d, J=7.8 Hz, 1H), 2.55-2.70 (m, 3H), 1.98-2.11 (m, 4H), 1.68 (dd, J=14.0, 5.7 Hz, 1H), 1.05 (d, J=6.2 Hz, 6H). ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 180.9, 178.5, 176.8, 142.6, 129.4, 128.3, 126.5, 121.5, 109.6, 68.0, 62.5, 56.9, 53.6, 49.8, 40.6, 40.5, 40.4, 40.3, 40.3, 40.2, 40.1, 40.0, 39.9, 39.8, 39.7, 39.5, 31.6, 31.5, 25.9, 15.2. Обчислено, %: C, 57,99; H, 5,17; N, 12,68; S, 9,68. C₁₆H₁₇N₃O₃S. Знайдено, %: C - 58,00; H-5,17; N-12,69; S-9,69.

Приклад 17

1-Метил-3'-[2-(етилтіо)етил]-3a'',6a'-дигідро-2'H-спіро[індоло-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-2,4'',6'-(1H, 3'H, 5'H)тріон (SI-179)



Дану сполуку одержували, застосовуючи методики, які були аналогічні методикам, описаним для синтезу прикладу 1, стадії 1 та 2, а замість 1-р-толіл-пірол-2,5-діону та ізатину використовували пірол-2,5-діон та 1-метил-ізатин відповідно. Вихід: 75 %. Білий кристалічний порошок з Т.пл. 217-218 °C (n-BuOH). LC/MS m/e 359 (M+H)⁺. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ: 11.34 (br. s., 1H), 7.27-7.36 (m, 1H), 6.91-7.10 (m, 3H), 4.20 (d, J=6.7 Hz, 1H), 3.77 (br. s., 1H), 3.47 (t, J=7.5 Hz, 1H), 3.30-3.39 (m, 1H), 3.23 (d, J=7.8 Hz, 1H), 3.10 (s, 3H), 2.57-2.69 (m, 2H), 1.97-2.08 (m, 1H), 1.61-1.70 (m, 1H), 1.14-1.26 (m, 3H). ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 178.8, 178.4, 176.7, 144.1, 129.6, 127.5, 126.2, 122.1, 108.6, 67.7, 57.1, 53.7, 49.8, 40.5, 40.4, 40.2, 40.0, 39.9, 39.7, 39.5, 32.1, 29.0, 26.2, 25.4, 15.3. Обчислено, %: C - 60,15; H-5,89; N-11,69; S-8,92. C₁₈H₂₁N₃O₃S. Знайдено, %: C - 60,14; H-5,90; N-11,70; S-8,93.

Приклад 18

Одержання солі L-аскорбінової та 5'-(4-метилфеніл)-3'-[2-(метилтіо)етил]-3a'',6a'-дигідро-2'H-спіро[індол-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-2,4'',6'-(1H, 3'H, 5'H)тріону

Наважку 5'-(4-метилфеніл)-3'-[2-(метилтіо)етил]-3a'',6a'-дигідро-2'H-спіро[індол-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-2,4'',6'-(1H, 3'H, 5'H)тріону (10 г, 24 ммоль) у 540 мл етанолу 96 % нагрівають при перемішуванні на водяному нагрівнику до утворення прозорого розчину, до якого додають еквімолярну кількість L-аскорбінової кислоти (4,18 г), розчиненої у 105 мл води очищеної (з розрахунку 1 г у 25 мл води очищеної). Отриманий розчин обережно випарюють на роторному випаровувачі у вакуумі, отримуючи ледь жовтуватого кольору сіль. За необхідності сіль перекристалізують із суміші вода: спирт (1:4). Вихід кількісний. Т.пл. 178 °C (з розкладанням). LC/MS m/e 421 (M+H)⁺, 176 (M+H)⁺. Обчислено, %: C - 58,28; H - 5,23; N-7,03; S-5,37. Знайдено, %: C - 58,29; H - 5,24; N-7,04; S-5,38.

Приклад 19

Одержання солі янтарної кислоти та 5'-(4-метилфеніл)-3'-[2-(метилтіо)етил]-3a'',6a'-дигідро-2'H-спіро[індол-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-2,4'',6'-(1H, 3'H, 5'H)тріону

Наважку 5'-(4-метилфеніл)-3'-[2-(метилтіо)етил]-3a'',6a'-дигідро-2'H-спіро[індол-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-2,4'',6'-(1H, 3'H, 5'H)тріону (10 г, 24 ммоль) у 540 мл етанолу 96 % нагрівають при перемішуванні на водяному нагрівнику до утворення прозорого розчину, до якого додають еквімолярну кількість янтарної кислоти (2,83 г) та перемішують до розчинення. Отриманий розчин обережно випарюють на роторному випаровувачі у вакуумі, отримуючи практично білу з ледь кремовим відтінком сіль. За необхідності сіль перекристалізують із суміші вода: спирт (1:4). Т.пл. 179-182 °C (з розкладанням). LC/MS m/e 421 (M+H)⁺, 118 (M+H)⁺. Вихід кількісний. Обчислено, %: C - 60,10; H - 5,42; N-7,79; S-5,94. Знайдено, %: C - 60,12; H - 5,43; N-7,78; S-5,92.

Приклад 20: Специфічна активність відносно 11β-HSD1 людини

Скринінг спіро[піролідино-3,2-оксіндолів] загальної формули I або II шляхом прецизійного молекулярного докінгу на 3D-моделі оксидоредуктази 11β-HSD1 людини (PDB ID 3BZU загальною доступної (Berman, et al. Announcing the worldwide Protein Data Bank, Nat. Struct. Biol. 10 (12)

(2003) 980; R.A. Schweizer, A.G. Atanasov, B.M. Frey, A. Odermatt, A rapid screening assay for inhibitors of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases (11 β -HSD): flavanone selectively inhibits 11 β -HSD1 reductase activity, Mol. Cell. Endocrinol. 212 (1-2) (2003) 41-49)) з використанням пакету програм AutoDock 4.2 та AutoDock Vina виявив здатність сполук заявленої формули I виступати інгібіторами зазначеного ферменту, що є ключовим у екстра наднирковому тканино-специфічному метаболізмі глюкокортикостероїдів та визнаною мішенню для конструювання анти діабетичних лікарських засобів (Schuster et al. J. Steroid Biochemistry & Molecular Biology 125 (2011) - P. 148-161).

В результаті процедури докінгу з використанням комплексу програми AutoDock було піддано 1318 гіпотетичних структур, з яких для 1305 структур одержано менші значення вільної енергії взаємодії з сайтом молекули 11 β -HSD1 A та B ($E_{\text{Doc}}=-5,47$ ккал/моль) ніж для комплексу такого відомого нестероїдного інгібітора 11 β -HSD1 як S-28, а 13 сполук виявилися неактивними, тобто мали значення вільної енергії від -0,2 до -5,46 ккал/моль для сайту A 11 β -HSD1, та від -0,9 до -5,39 ккал/моль - для сайту B 11 β -HSD1. Для бази з 1318 структур 95,91 % структур виявилися активними, тобто мали значення вільної енергії для сайту A від -11,37 до -5,48 ккал/моль, та від -10,93 до -5,51 ккал/моль - для сайту B. Найбільш активними виявилися сполуки, що містили залишки аліфатичних сірковмісних амінокислот за положенням 2' піролідинового циклу, та мали наномольні константи інгібування. Так, наприклад, сполука SI-86 виявляє інгібуючу активність відносно 11 β -HSD1 з константою інгібування ферменту, що становить $K_i=4,14$ нМ (E , ккал/mol-8,87 та -8,54 при $T=298,15$ KJ, що перевищує аналогічний показник відомих нестероїдних інгібіторів (табл. 1).

Таблица 1

Активність відносно людської 11 β -HSD1

Сполука	K_i , нМ
SI-86	4,14 \pm 0,25
SI-34	4,41 \pm 0,32
SI-176N	2,55 \pm 0,22
SI-0076	9,76 \pm 1,11
AMG 221	12,80 \pm 1,70

Приклад 21

Оцінка протиішемічних та мнемоторних властивостей на прикладі сполуки SI-86 при модельному геморагічному інсульті.

У досліджах на щурах із внутрішньомозковим крововиливом середнього ступеня тяжкості, який моделювали шляхом ін'єкції у внутрішню капсулу головного мозку автокрові (20 мкл/100 г) встановлено, що введення похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу (сполука SI-86) у дозі 10 мг/кг внутрішньошлунково в лікувальному режимі (через 1 годину після відтворення інсульту та далі через кожні 24 год. упродовж 21 доби) ефективніше за внутрішньоочеревинне введення цитиколіну (250 мг/кг), актовегіну (16 мг/кг) та пірацетаму (400 мг/кг) зменшує летальність та неврологічний дефіцит у гострому та відновлювальному періодах інсульту, а також покращує мнестичні функції. За величиною своїх церебропротекторних властивостей сполука SI-86 співставлялась з мексидолом (100 мг/кг внутрішньоочеревинно). Отримані дані експериментально обґрунтовують доцільність використання цієї речовини як церебропротекторного засобу.

Нейропротективну дію похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу (сполука SI-86) вивчали на моделі ВМК середнього ступеня тяжкості, який моделювали під пропофоловим наркозом (60 мг/кг ввнутрішньоочеревинно (в/о)) шляхом введення у внутрішню капсулу головного мозку (стереотоксичні координати проєкції: $H=7,0$ мм, $L=3,0$ мм, $A=1,5$ мм від брегми) автокрові (20 мкл/100 г) (Метод відтворення інтрацеребральної геморагії у білих щурів/ О.К. Ярош, С.В. Кириченко, С.П. Халімончик [та інш.]// Кровообіг та гемостаз. - 2005. - № 1. - С. 77-81). Вибрана модель дозволяє відтворити клінічну картину ішемічного інсульту і є адекватною для клінічного вивчення потенційних нейропротекторних речовин.

Як препарати порівняння використовували такі препарати: мексидол ("Мексидол", НВК Фармасофт, Росія), 100 мг/кг; цитиколін ("Сомазина" Ferrer Snternational, S.A., Іспанія), 250 мг/кг; актовегін ("Актовегін", Nyscomed, Австрія), 16 мг/кг пірацетам ("Пірацетам" Дарниця, Україна), 400 мг/кг. Згідно останніх клінічних настанов стосовно лікування хворих з ГПМК, схвалених Міністерством охорони здоров'я України (наказ № 602 від 03.08.2012), всі ці препарати

дозволено включати до схем інтенсивної терапії хворих з ГПМК у якості нейропротекторів. Їх застосовували в рекомендованих для доклінічних досліджень дозах (McGrow C.P. Experimental Cerebral Infarction Effects of Pentobarbital in Mongolian Gerbils/ C.P. McGrow// Arch. Neurol. - 1977. - Vol. 34, № 6. - P. 334-336). Експериментальну терапію гострої церебральної ішемії сполукою

5 SI-86 та препаратами порівняння розпочинали через 1 год. після ВМК один раз на день упродовж 21 доби. Похідне SI-86 досліджували в умовно-ефективній дозі 10 мг/ кг внутрішньошлунково (в/ш) - доза, яка за результатами наших попередніх дослідження забезпечує максимальну антигіпоксичну активність сполуки SI-86. Референс-препарати вводили внутрішньоочеревинно (в/о). Щурам групи контрольної патології вводили автокров та як терапію вводили 0,9 % розчин NaCl із розрахунку 2 мл/кг в/о.

Псевдооперованих щурів піддавали всім втручанням (наркоз, трепанація черепа) за виключенням введення автокрові, що нівелювало вплив травматичних умов експерименту.

Неврологічний дефіцит у тварин із ГПМК відповідно у гострому (4-та доба) та відновлювальному (21-ша доба) періодах визначали за шкалою stroke-index C.P. McGrow [13].

15 Тяжкість стану визначали за сумою відповідних балів: до 3 балів - легкий ступінь, від 3 до 7 балів - середній ступінь, вище 7 балів - тяжкий ступінь. Відмічали парези, паралічі кінцівок, тремор, манежні рухи, птоз, положення на боці, здатність щурів утримуватися на стрижні діаметром 15 см, що обертався зі швидкістю 3 об/хв. Тварин тестували щоденно, виставляючи суму балів:

20 однобічний напівптоз - 0,5 бала;
 однобічний птоз - 1 бал;
 тремор - 0,5 бала;
 манежні рухи - 0,5 бала;
 парези кінцівок (за кожну кінцівку) - 1 бал;
 25 параліч кінцівок (за кожну кінцівку) - 2 бали;
 бокове положення - 3 бали;
 нездатність утриматись на обертовому стрижні протягом 4 хв. - 3 бали.

Оцінку здатності тварин до навчання та запам'ятовування аверсивного стимулу досліджували в тесті умовної реакції пасивного уникання (УРПУ) [2]. Методика заснована на вродженому інстинкті щурів до обмеженого затемненого простору. Навчання щурів проводили в двокамерній установці, що складається з двох відсіків - світлого та темного. Тварину вміщували до світлого відсіку, фіксували латентний час входу в темний відсік, де щур отримував подразнення електричним струмом та вибігав у світлий відсік. Збереження УРПУ перевіряли через добу за зміною латентного часу входу щура до темного відсіку. Також відмічали кількість тварин, які повністю не зайшли в темну камеру. Критеріями церебропротекторної ефективності досліджуваних сполук служили також термін загибелі тварин (у днях) та їх летальність (у %).

35 Будь-які травматичні маніпуляції та евтаназію тварин шляхом декапітації виконували в умовах пропофолового наркозу ("Fresenius Kabi", Австрія).

Кількісні дані обробляли за допомогою програми статистичної обробки StatPlus 2009. Статистичну значущість відмінностей оцінювали за кутовим перетворенням Фішера (летальність), також використовували параметричний критерій t Ст'юдента у випадках нормального розподілу варіаційного ряду, непараметричний критерій W Уайта - за його відсутності.

45 Як видно із даних, представлених у таблиці 2, при модельному ВМК усі досліджувані речовини, за винятком пірацетаму, сприяли зменшенню показника летальності тварин в умовах даного патологічного стану, що вказувало на наявність у них церебропротекторного ефекту. Однак, за величиною захисного впливу на ішемізований головний мозок вони мали певні якісні відмінності. Найбільш потужні нейропротекторні властивості продемонструвало похідне 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу (сполука SI-86) (10 мг/кг в/ш), мексидол (100 мг/кг в/о) та цитиколін (250 мг/кг в/о), забезпечуючи 100 % церебропротекторний захист (на 24 год. спостереження показник летальності у групах тварин, які отримували ці препарати дорівнював 0 % проти 17,4 % у контролі). Впродовж 48 год. спостереження у щурів, яким проводили терапію сполукою SI-86 не було відмічено жодного летального випадку, на відміну від лікування мексидолом та цитиколіном де смертність тварин з ВМК сягала відповідно 7,9 та 8,5 %. За величиною церебропротекторної дії в зазначений термін експериментального ГІ сполука SI-86 (10 мг/кг в/ш) вірогідно перевершувала мексидол (100 мг/кг в/о), цитиколін (250 мг/кг в/о) та актовегін (16 мг/кг в/о). Курсове введення похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу, так само, як і мексидолу, цитиколіну та актовегіну впродовж 4 діб терапії, починаючи з моменту відтворення патології, забезпечило зменшення летальності щурів в кінці терміну спостереження відносно контролю в 60 середньому відповідно на 18,6; 17,2; 15,1 та 9,3 % ($p < 0,05$). Слід зауважити, що пірацетам

суттєво не вплинув на зниження смертності тварин з ГІ. Така низька ефективність пірацетаму в цих умовах, цілком узгоджується з неоднозначними клінічними результатами стосовно його раннього призначення при ГПМК.

Таким чином, характеризуючи результати проведеного дослідження оцінки церебропротекторної дії похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу (сполука SI-86), мексидолу, цитиколіну та актовегіну в умовах модельного внутрішньочеребрального крововиливу, можна зробити висновок, що, певною мірою, усім їм, притаманний захисний вплив на ішемізований головний мозок. Найбільша нейропротекторна активність була виявлена у сполуки SI-86 (10 мг/кг в/ш) на 48 год. спостереження, коли за своєю ефективністю він вірогідно переважав усі референс-препарати. За величиною церебропротекторного ефекту в зазначений період ГІ досліджувані препарати можна розташувати у наступній послідовності: сполука SI-86 (10 мг/кг в/ш) > мексидол (100 мг/кг в/о) > цитиколін (250 мг/кг в/о) > актовегін (16 мг/кг в/о) > пірацетам (400 мг/кг в/о).

Як свідчать літературні дані, інтегративними показниками, що дозволяють оцінити якість захисного впливу потенційного нейропротектора на ішемізований головний мозок, поряд із зменшенням летальності є швидка ліквідація неврологічного дефіциту та покращення мнестичних функцій. Саме тому було доцільним дати оцінку церебропротекторних властивостей похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу за динамікою неврологічного статусу щурів у модельним ГІ

Таблиця 2

Вплив похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу (сполука SI-86) та деяких церебропротекторів при внутрішньоочеревинному лікувальному введенні на летальність щурів з інтрацеребральною геморагією середнього ступеня важкості

Термін, год.	Летальність, абс./%						
	Псевдо-оперовані тварини + 2 мл/кг 0,9 % NaCl, в/о n=30	Контрольна патологія ВМК+2 мл/кг 0,9 % NaCl, в/о n=46	ВМК + SI-86 (10 мг/кг, в/ш), n=34	ВМК + мексидол (100 мг/кг), n=38	ВМК + цитиколін (250 мг/кг), n=47	ВМК + актовегін (16 мг/кг), n=47	ВМК + пірацетам (400 мг/кг), n=41
12	0/0 %	4/8,7 %°	0/0 %	0/0 %*#	0/0 %*#	0/0 %*#	2/4,9 %°
24	0/0 %	8/17,4 %°	0/0 %*#	0/0 %*#	0/0 %*#	1/6,4 %*#	6/14,6 %°
48	0/0 %	10/21,7 %°	0/0 %*#&\$	3/7,9 %°*#	4/8,5 %°*#	4/8,5 %°*#	9/ 22 %°
72	0/0 %	12/26,1 %°	2/5,9 %°*#	4/10,5 %°*#	6/12,8 %°*	7/21,1 %°*	10/24,4 %°
96	0/0 %	14/30,4 %°	4/11,8 %°*#	5/13,2 %°*	7/14,9 %°*	8/21,1 %°	11 /27,5 %°

Примітки:

1. ІГ - інтрацеребральна геморагія;
2. ° р<0,05 відносно псевдо оперованих тварин;
3. * - р<0,05 відносно контролю;
4. # - р<0,05 відносно пірацетаму (400 мг/кг в/о);
5. & - р<0,05 відносно мексидолу (100 мг/кг в/о);
6. - - р<0,05 відносно цитиколіну (250 мг/кг в/о);
7. \$ - р<0,05 відносно актовегіну (16 мг/кг в/о)

Таблиця 3

Вплив похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу (сполука SI-86) на неврологічний дефіцит у щурів з інтрацеребральною геморагією (M±m, n=15)

Групи тварин	Термін, доба	
	4	21
Псевдооперовані тварини + 2 мл/кг 0,9 % NaCl, в/о	0,0±0,0	0,0±0,0
Контрольна патологія ВМК + 2 мл/кг 0,9 % NaCl, в/о	7,40±0,33°	4,70±0,25°
ВМК + SI-86 (10 мг/кг, в/ш)	4,10±0,32°*#&\$	3,10±0,33°*#&\$
ВМК+ мексидол (100 мг/кг, в/о)	4,30±0,25°*#&\$	3,80±0,21°*#&\$
ВМК+ цитиколін (250 мг/кг, в/о)	5,00±0,18°*#&\$	3,10±0,15°*#&\$
ВМК + актовегін (16 мг/кг, в/о)	5,80±0,15°*#	4,20±0,25°*#
ВМК + пірацетам (400 мг/кг, в/о)	6,90±0,39°	4,10±0,15°*

Примітки:

1. ВМК - внутрішньомозковий крововилив; в/ш - внутрішньошлунково; в/о - внутрішньоочеревинно;
2. ° - $p < 0,05$ відносно псевдооперованих тварин;
3. * - $p < 0,05$ відносно контрольної патології;
4. # - $p < 0,05$ відносно пірацетаму (400 мг/кг в/о);
5. ° - $p < 0,05$ відносно цитиколіну (250 мг/кг в/о);
6. 7. \$ - $p < 0,05$ відносно актовегіну (16 мг/кг в/о)

Експериментальне лікування щурів із ГПМК сполукою SI-86, як і мексидолом, цитиколіном та актовегіном, сприяла покращенню неврологічного статусу починаючи вже перших діб церебральної ішемії (табл. 3). Аналізуючи динаміку регресу неврологічного дефіциту, можна відзначити, що у ранній період ГПМК похідне 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу вірогідно переважало цитиколін та актовегін, співставляючись при цьому з мексидолом: на 4-ту добу спостереження середній бал за шкалою С.Р. McGrow становив 4,1 проти 5,0; 5,8 та 6,9 ($p < 0,05$). У відновлювальному періоді модельного ГІ лідерами виявились сполука SI-86 та цитиколін. Вони продемонстрували однакову спроможність знижувати неврологічну симптоматику - середній бал за шкалою С.Р. McGrow становив 3,1 проти 4,7 у групі контролю та 3,8; 4,2 і 4,1 на тлі введення мексидолу, актовегіну та пірацетаму (табл. 4). Щодо відновлення мнестичних функцій у пізній період ГІ, сполука SI-86 вірогідно краще за усі досліджувані референс-препарати сприяв покращенню досліджуваних показників тесту УРПУ (табл. 4).

Таблиця 4

Вплив похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу (сполука SI-86) при лікувальному введенні на навчання та пам'ять щурів з інтрацеребральною геморагією на 21 добу експерименту за тестом умовної реакції пасивного уникнення ($M \pm m$, $n=15$)

Групи тварин	Латентний період входу в темну камеру, с	
	до навчання	через 24 год. після навчання
Псевдооперовані тварини + 2 мл/кг 0,9 % NaCl, в/о	5,20±0,35	219,1±2,53
Контрольна патологія ВМК + 2 мл/кг 0,9 % NaCl, в/о	19,90±0,57	42,50±0,88°
ВМК + SI-86 (10 мг/кг, в/ш)	9,50±0,34 ^{°*#-\$}	127,10±2,71 ^{°*#-\$}
ВМК+ мексидол (100 мг/кг, в/о)	11,30±0,47 ^{°*#-\$}	106,80±2,77 ^{°*#-\$}
ВМК + цитиколін (250 мг/кг, в/о)	12,50±0,75 ^{°*#}	106,30±3,87 ^{*#}
ВМК + актовегін (16 мг/кг, в/о)	14,90±0,48 ^{°*#}	87,70±3,07 ^{*#}
ВМК + пірацетам (400 мг/кг, в/о)	15,90±0,51 ^{°*}	71,10±2,21 [*]

Примітки:

1. ВМК - внутрішньомозковий крововилив; в/ш - внутрішньошлунково; в/о - внутрішньоочеревинно;
2. ° - $p < 0,05$ відносно псевдооперованих тварин;
3. * - $p < 0,05$ відносно контрольної патології;
4. # - $p < 0,05$ відносно пірацетаму (400 мг/кг в/о);
5. ° - $p < 0,05$ відносно цитиколіну (250 мг/кг в/о);
6. \$ - $p < 0,05$ відносно актовегіну (16 мг/кг в/о)

За здатністю покращувати мнестичні функції у відновлювальний період модельного ГІ усі речовини можна розташувати у наступній послідовності: SI-86 (10 мг/кг в/о) ≥ мексидол (100 мг/кг в/о) ≥ цитиколін (250 мг/кг в/о) ≥ актовегін (16 мг/кг в/о) пірацетам (400 мг/кг в/о).

Оригінальне похідне SI-86 значно зменшує летальність щурів та неврологічний дефіцит у гострому та відновлювальному періодах внутрішньомозкового крововиливу, сприяє покращенню мнестичних функцій, перевершуючи цитиколін, актовегін та пірацетам.

Приклад 22

Оцінка коригувального впливу похідних 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу (сполука SI-86) на динаміку рівня кортикостерону та стероїдної ексайтотоксичності

Нейропротективну дію похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу (сполука SI-86) вивчали у щурів лінії Вістар на моделі гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК) за ішемічним типом у передньомозковому басейні шляхом створення білатеральної каротидної оклюзії (БКО) за рахунок перев'язки каротидних артерій. Лігатури на загальні сонні артерії накладали під пропофоловим наркозом у дозі 60 мг/кг внутрішньоочеревинно (в/о), використовуючи хірургічний доступ на передній поверхні шиї розрізом через її білу лінію. Обрана модель дозволяє відтворити клінічну картину ішемічного інсульту і є адекватною для клінічного вивчення потенційних нейропротекторних речовин (Drug discovery and evaluation: pharmacological assays/ H. Gerhard Vogel (ed.). - 2nd ed. 1453 p.).

Як препарат порівняння використовували цитиколін ("Сомазіна" Ferrer Snternational, S.A., Іспанія) в рекомендованій для доклінічних досліджень дозі 250 мг/кг в/о (Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов: метод. Рекомендации/ [И.С. Чекман, Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев и др.]. - Киев, 2010. - 81 с). Експериментальну терапію гострої церебральної ішемії сполукою SI-86 та цитиколіном розпочинали через 1 год. після БКО, а далі один раз на день упродовж 21 доби. Похідне 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу досліджували в умовно-ефективній дозі 10 мг/ кг внутрішньошлунково (в/ш) - доза, яка за результатами наших попередніх дослідження забезпечує максимальну антигіпоксичну активність сполуки SI-86. Референс-препарати вводили внутрішньоочеревинно (в/о). Щурам групи контрольної патології виконували БКО та в якості терапії вводили 0,9 % розчин NaCl із розрахунку 2 мл/кг в/о.

Псевдооперованих щурів піддавали всім втручанням (наркоз, розріз шкіри, препарування судин) за виключенням перев'язування артерій, що нівелювало вплив травматичних умов експерименту.

Для визначення рівня кортикостерону (видоспецифічний аналог кортизолу у щурів, який є також субстратом для 11 β -HSD1) у відповідні строки (4-та та 21-ша доба ГПМК) у щурів, шляхом пункції сагітального синусу, брали проби крові (0,2-0,4 мл). Рівень кортизолу вимірювали методом твердофазного імуноферментного аналізу з використанням набору CORTICOSTERONE KIT (Німеччина) на приладі фірми "Hipson" (Чехія).

Для з'ясування впливу курсового введення сполуки SI-86 на синтез стероїдів у тварин без церебральної ішемії додатково визначали динаміку його рівня у псевдооперованих щурів в аналогічні періоди.

Оперативне втручання (розріз шкіри, препарування судин) супроводжувалось підвищенням рівня кортикостерону відносно інтактних тварин, (їм не виконували жодних травматичних маніпуляцій) про що свідчило збереження його високого титру (в середньому на 33,6 %) навіть 4-ту добу після операції (p<0,05). Таке зростання рівня 11 β -кортикостерону можна пояснити стресовою реакцією тварин на травму і є закономірним для раннього післяопераційного періоду. В подальшому (21-ша доба експерименту) відмічалась нормалізація рівня досліджуваного гормону і його вміст в крові не відрізнявся від інтактних щурів (табл. 5)

Таблиця 5

Вплив сполуки SI-86 на динаміку рівня 11 β -кортикостерону (нг/мл) у венозній крові щурів із білатеральною каротидною оклюзією (M \pm m, n=5-7)

Групи тварин	Термін, доба	
	4	21
Інтактні тварини	90,04 \pm 4,32	
Псевдооперовані тварини + 0,9 % NaCl (2 мл/кг)	120,25 \pm 2,05 ^{o*}	93,20 \pm 3,59 ^{*-}
Псевдооперовані тварини + SI-86 (10 мг/кг в/ш)	81,95 \pm 0,61 [*] (-31,9 %)	83,02 \pm 4,25 [*] (-10,2 %)
Контрольна патологія БКО+ 0,9 % NaCl (2 мл/кг в/о)	468,00 \pm 14,07 ^o (+289,2 %)	337,19 \pm 7,90 ^{o-} (+261,8 %)
БКО +SI-86 (10 мг/кг в/ш)	186,12 \pm 1,43 ^{o*#} (+54,8 %) [-60,2 %]	144,67 \pm 3,43 ^{o*##} (+55,2 %) [-57,1 %]
БКО + цитиколін (250 мг/кг в/о)	272,79 \pm 1,95 ^{o*} (+126,9 %) [-41,7 %]	235,52 \pm 7,82 ^{o*~} (+152,7 %) [-30,2 %]

Примітки:

1. БКО - білатеральна каротидна оклюзія; в/ш - внутрішньошлунково; в/о внутрішньоочеревинно;
2. ° $p < 0,05$ відносно інтактних тварин;
3. * - $p < 0,05$ відносно контрольних тварин у відповідний термін спостереження;
4. # - $p < 0,05$ відносно цитиколіну;
5. - $p < 0,05$ відносно 4 доби у відповідній експериментальній групі;
6. в круглих дужках - динаміка у відсотках відносно групи псевдооперованих тварин у відповідний термін спостереження;
7. в квадратних дужках - динаміка у відсотках відносно групи контрольної патології у відповідний термін спостереження

Введення псевдооперованим щурам сполуки SI-86 (10 мг/кг в/ш) нівелювало вплив травматичних маніпуляцій, на що вказувала стабільна концентрація в крові рівня 1 β -кортикостерону, яка була порівнянна з показником у інтактних тварин. Цей факт може свідчити про наявність у досліджуваного похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу стреспротекторних властивостей.

Аналіз динаміки рівня кортикостерону у щурів в умовах БКО показав, що через 96 год. (4-та доба) після моделювання патології, його рівень вірогідно підвищився відносно аналогічного показника у псевдооперованих тварин у 3,9 разу, при цьому, в кінці спостереження (21-ша доба), його титр продовжував залишатись підвищеним у 3,6 разу (табл.). Зважаючи на те, що кортикостерон досліджували в крові сагітального синуса головного мозку, можна з певною вірогідністю говорити про формування стероїдної ексайтотоксичності, яка зберігається і у відновному періоді ГПМК.

Отримані нами дані узгоджуються з результатами інших дослідників, які вивчали динаміку рівня кортикостерону у різні періоди гострої церебральної ішемії та при розвитку нейродеструктивних захворювань. Підвищення рівня глюкокортикоїдів має морфогенетичний вплив на функціонування нейронів головного мозку [Herbert J. et al., 2006; Goodyer I. M. et al., 2006]. Зокрема з високим рівнем кортикостерону в умовах ГПМК корелює зменшення щільності нейронів гіпокампа, ініціація нейроаптозу, розвиток значного неврологічного дефіциту, порушення мнестичних функцій та значна летальність.

Лікувальне курсове введення тваринам з ГПМК похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу сполуки SI-86 (10 мг/кг в/ш), подібно цитиколіну (250 мг/кг в/о), супроводжувалось менш інтенсивним зростанням рівня кортикостерону. Так, через 96 год. його вміст в крові сагітального синуса зменшився відносно групи контрольної патології відповідно на 60,2 % та 41,7 %, а через 21 добу - 57,1 % та 30,2 % відповідно ($p < 0,05$). Така дія досліджуваних речовин, може свідчити про наявність у них модулювальної дії на розвиток стероїдної ексайтотоксичності. Причому, в умовах гострої церебральної ішемії за здатністю знижувати вміст досліджуваного гормону, як у гострий так і у відновлювальний період ГПМК, терапія сполукою SI-86, по ефективності вірогідно переважає введення цитиколіну відповідно у 1,46 та 1,62 разу.

На нашу думку, наявність коригувального впливу сполуки SI-86 на баланс глюкокортикоїдів може вказувати на його здатність перешкоджати розвитку деструктивних змін в ішемізованому мозку, сприяти збереженню структурної цілісності нейронів, і як наслідок, зменшувати вогнище ішемії та зону пенумбри. Слід відмітити, що подібна дія похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу однаково проявився, як у гострому, так і у відновлювальному періоді ішемії. Антистероїдний ефект сполуки SI-86 в умовах ГПМК може бути ведучим механізмом його церебропротекторної дії. Важливим є також те, що введення досліджуваної речовини знижує тільки підвищений рівень кортикостерону і його титр не відрізняється від фізіологічного навіть при курсовій терапії. Останнє вказує на безпечність його застосування.

Таким чином, результати дослідження вказують на основні клітинні патогенетичні ланки ішемії в умовах ГПМК (модулювальний вплив на стероїдну ексайтотоксичність)перспективність поглибленого дослідження нейропротекторної дії похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу (сполука SI-86). Зазначені якості сполуки SI-86 в умовах гострої церебральної ішемії є бажаними, оскільки враховуючи можливість ентерального введення та наявність впливу на первинні патогенетичні ланки ішемічного каскаду є всі підстави для його можливого призначення як хворим у різні періоди ГПМК, так і пацієнтам з хронічною цереброваскулярною патологією.

Приклад 23

Позитивний лікувальний вплив на динаміку процесів нейродеструкції при гострій церебральній ішемії (за динамікою активності нейрон-специфічної енолази (NSE))

Для більш ґрунтовного з'ясування ступеня її захисної дії на головний мозок при гострому порушенні мозкового кровообігу (ГПМК), було оцінено вплив курсової терапії похідним 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу (сполука SI-86) на інтенсивність перебігу деструктивних змін в мембранах нейронів за динамікою активності нейрон-специфічної енолази (NSE), яка є раннім маркером пошкодження нервової тканини. NSE - міститься переважно в нейронах та нейроендокринних клітинах. При неврологічних захворюваннях, у тому числі при ГПМК, відмічається вихід нейрон-специфічних ензимів та їх ізоферментів із пошкоджених нейронів, що дозволяє дослідити глибину та інтенсивність структурно-функціональних порушень біомембран у ЦНС на ранніх етапах (Davalos A. Citicoline in the treatment of acute ischaemic stroke: an international, randomised, multicentre, placebo-controlled study (ICTUS trial)/A. Davalos, J. Alvarez-Sabin, J. Castillo// Lancet. - 2012. - 380. - P. 349-357).

У досліджах на щурах із модельним гострим порушенням мозкового кровообігу (білатеральна каротидна оклюзія) встановлено, що введення похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу (сполука SI-86) у дозі 10 мг/кг внутрішньошлунково в лікувальному режимі (через 1 годину після відтворення інсульту та далі через кожні 24 год. упродовж 21 доби) ефективніше за внутрішньоочеревинне введення цитиколіну (250 мг/кг), зменшує активність нейрон-специфічної енолази, що свідчить про послаблення досліджуваними речовинами нейродеструктивних змін в головному мозку тварин.

Експериментальну терапію гострої церебральної ішемії сполукою SI-86 та цитиколіном ("Сомазина" Ferrer Snternational, S.A., Іспанія) розпочинали через 1 год. після БКО, а далі один раз на день упродовж 21 доби. Похідне 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу досліджували в умовно-ефективній дозі 10 мг/ кг внутрішньошлунково (в/ш) - доза, яка за результатами наших попередніх дослідження забезпечує максимальну антигіпоксичну активність сполуки SI-86. Референс-препарати вводили внутрішньоочеревинно (в/о). У наших дослідженнях цитиколін в умовах експериментального ГПМК вводили в/о в рекомендованій для доклінічних досліджень дозі 250 мг/кг. Щурам групи контрольної патології виконували БКО та в якості терапії вводили 0,9 % розчин NaCl із розрахунку 2 мл/кг в/о.

Псевдооперованих щурів піддавали всім втручанням (наркоз, розріз шкіри, препарування судин) за виключенням перев'язування артерій, що нівелювало вплив травматичних умов експерименту.

Для визначення специфічного маркера ішемії головного мозку нейронспецифічної енолази - у відповідні строки (4-та та 21-ша доба ГПМК) у щурів, шляхом пункції сагітального синусу, брали проби крові (0,2-0,4 мл). Активність NSE вимірювали методом твердофазного імуноферментного аналізу з використанням набору NSE EIA KIT (DAI, США) на приладі фірми "Hirson" (Чехія).

Будь-які травматичні маніпуляції та евтаназію тварин шляхом декапітації виконували в умовах пропофолового наркозу.

Кількісні дані обробляли за допомогою програми статистичної обробки StatPlus 2009. Використовували параметричний критерій t Ст'юдента у випадках нормального розподілу варіаційного ряду, непараметричний критерій W Уайта - за його відсутності.

Результати та їх обговорення. Аналіз динаміки активності досліджуваного маркера у щурів в умовах БКО показав, що через 96 год. (4-та доба) після моделювання патології, його рівень вірогідно підвищився відносно аналогічного показника у псевдооперованих тварин у 10,5 разу, при цьому, в кінці спостереження (21-ша доба), активність NSE продовжувала залишатись підвищеною майже у 7,1 разу (табл. 6).

Таблиця 6

Позитивний вплив курсового введення щурам із гострою церебральною ішемією сполуки SI-86 на динаміку нейродеструктивних змін ($M \pm m$, $n=7$)

Групи тварин	Термін, доба	
	4	21
Псевдооперовані тварини + 2 мл/кг 0,9 % NaCl, в/о	0,118±0,001	0,110±0,005
Контрольна патологія БКО + 2 мл/кг 0,9 % NaCl, в/о	1,238±0,059*	0,784±0,033*
БКО + SI-86 (10 мг/кг, в/ш)	0,61±0,004* [#]	0,204±0,015* [#]
БКО + цитиколін (250 мг/кг, в/о)	0,972±0,010* [#]	0,385±0,010* [#]

Примітки:

1. БКО - білатеральна каротидна оклюзія; в/ш - внутрішньошлунково; в/о внутрішньоочеревинно;
2. ° $p < 0,05$ відносно показника псевдооперованих щурів;
3. * - $p < 0,05$ відносно показника контрольної патології;
5. ° - $p < 0,05$ відносно показника групи цитиколіну

Отримані нами результати стосовно коливань активності енолази у різні періоди інсульту співпадають із літературними даними [Rohlwink UK, Figaji AA. Biomarkers of Brain Injury in Cerebral Infections// Clin Chem. 2013 Oct 29.]. Так, на думку дослідників, значне підвищення NSE в гострий період церебральної ішемії відбувається переважно за рахунок деструкції нейронів внаслідок безпосереднього впливу ішемічного чинника на внутрішньоклітинний метаболізм. У більш пізній період ГПМК, коли активуються адаптивні та репаративні процеси активність енолази поступово зменшується, однак не знижується до нормальних цифр.

Подібна негативна динаміка активності NSE в умовах ГПМК, свідчить не тільки про значну величину вогнища ішемії, а й дозволяє з певною вірогідністю передбачити несприятливий прогноз для хворого (летальний кінець, значне погіршення когнітивно-мнестичних функцій, втрату адаптаційних можливостей до навколишнього середовища, тощо).

Лікувальне курсове введення тваринам з ГПМК похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу сполуки SI-86 (10 мг/кг в/ш), подібно цитиколіну (250 мг/кг в/о), супроводжувалося менш інтенсивним зростанням активності NSE. Так, через 96 год. активність ферменту зменшилась відносно групи контрольної патології відповідно у 2,03 та 1,27 разу, а через 21 добу - у 3,84 та 2,03 разу відповідно ($p < 0,05$). Така дія досліджуваних препаратів, свідчить про наявність у них цитопротекторного ефекту. Причому, в умовах гострої церебральної ішемії за здатністю зменшувати активність маркера нейродеструкції, як у гострий так і у відновлювальний період ГПМК, терапія сполукою SI-86, по ефективності вірогідно переважає введення цитиколіну відповідно у 1,6 та 1,9 разу. Позитивна динаміка активності NSE на тлі курсового введення сполуки SI-86 вказує на його здатність прешкоджати розвитку деструктивних змін в ішемізованому мозку, сприяти збереженню структурної цілісності нейронів, і як наслідок, зменшувати вогнище ішемії та зону пенумбри. Важливим є також те, що цитопротекторні ефекти похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу однаково проявились, як у гострому, так і у відновлювальному періоді ішемії.

Приклад 24: Порівняльна оцінка впливу похідних 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу (сполука SI-86) на динаміку нейродеструктивних змін при модельному інтрацеребральному крововиливі (за динамікою активності NSE)

У дослідках на щурах із внутрішньомозковим крововиливом середнього ступеня тяжкості, який моделювали шляхом ін'єкції у внутрішню капсулу головного мозку автокрові (20 мкл/100 г) встановлено, що введення похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу (сполука SI-86) у дозі 10 мг/кг внутрішньошлунково в лікувальному режимі (через 1 годину після відтворення інсульту та далі через кожні 24 год. упродовж 21 доби) ефективніше за внутрішньоочеревинне введення цитиколіну (250 мг/кг), зменшує активність нейрон-специфічної енолази, що свідчить про послаблення досліджуваними речовинами нейродеструктивних змін в головному мозку тварин.

Експериментальну терапію гострої церебральної ішемії сполукою SI-86 та цитиколіном розпочинали через 1 год. після БКО, а далі один раз на день упродовж 21 доби. Похідне 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу досліджували в умовно-ефективній дозі 10 мг/кг внутрішньошлунково (в/ш) - доза, яка за результатами наших попередніх дослідження забезпечує максимальну антигіпоксичну активність сполуки SI-86. Референс-препарати вводили внутрішньоочеревинно (в/о). У наших дослідженнях цитиколін в умовах експериментального ГПМК вводили в/о в рекомендованій для доклінічних досліджень дозі 250 мг/кг [Чекман І.С. др., 2010; Ходаківський О.А., Черешнюк І.Л., 2013]. Щурам групи контрольної патології вводили аутокров та як терапію вводили 0,9 % розчин NaCl із розрахунку 2 мл/кг в/о.

Псевдооперованих щурів піддавали всім втручанням (наркоз, трепанація черепа) за виключенням введення автокрові, що нівелювало вплив травматичних умов експерименту.

Для визначення специфічного маркера ішемії головного мозку нейронспецифічної енолази - у відповідні строки (4-та та 21-ша доба ГПМК) у щурів, шляхом пункції сагітального синусу, брали проби крові (0,2-0,4 мл). Активність NSE вимірювали методом твердофазного імуоферментного аналізу з використанням набору NSE EIA KIT (DAI, США) на приладі фірми "Hirson" (Чехія).

Будь-які травматичні маніпуляції та евтаназію тварин шляхом декапітації виконували в умовах пропофолового наркозу.

Кількісні дані обробляли за допомогою програми статистичної обробки StatPlus 2009. Використовували параметричний критерій t Стьюдента у випадках нормального розподілу варіаційного ряду, непараметричний критерій W Уайта - за його відсутності.

- 5 Аналіз динаміки активності досліджуваного маркера у щурів в умовах ВМК показав, що через 96 год. (4-та доба) після моделювання патології, його рівень вірогідно підвищився відносно аналогічного показника у псевдооперованих тварин у 18,9 разу, при цьому, в кінці спостереження (21-ша доба), активність NSE продовжувала залишатись підвищеною майже у 8,8 разу (табл. 7).

Таблиця 7

Вплив курсового введення сполуки SI-86 на динаміку
нейродеструктивних змін у щурів із гострою церебральною геморагією ($M \pm m$, $n=7$)

Групи тварин	Термін, доба	
	4	21
Псевдооперовані тварини + 2 мл/кг 0,9 % NaCl, в/о	0,149 \pm 0,008	0,140 \pm 0,015
Контрольна патологія БКО + 2 мл/кг 0,9 % NaCl, в/о	2,816 \pm 0,048*	0,947 \pm 0,017*
БКО + SI-86 (10 мг/кг, в/ш)	1,065 \pm 0,019*#	0,260 \pm 0,014*#
БКО + цитиколін (250 мг/кг, в/о)	1,292 \pm 0,069*#	0,309 \pm 0,05*#

Примітки:

1. ВМК - внутрішньомозковий крововилив; в/ш - внутрішньошлунково; в/о - внутрішньоочеревинно;
- 2* - $p < 0,05$ відносно показника псевдооперованих щурів;
3. # - $p < 0,05$ відносно показника контрольної патології;
5. - $p < 0,05$ відносно показника групи цитиколіну

10

Отримані нами результати стосовно коливань активності енолази у різні періоди інсульту співпадають із літературними даними [Пискунов А.К., 2010; Гришанова Т.Г. и др, 2011]. Так, на думку дослідників, значне підвищення NSE в гострий період церебральної ішемії відбувається переважно за рахунок деструкції нейронів внаслідок безпосереднього впливу ішемічного чинника на внутрішньоклітинний метаболізм. У більш пізній період ГПМК, коли активуються адаптивні та репаративні процеси активність енолази поступово зменшується, однак не знижується до нормальних цифр.

15

Подібна негативна динаміка активності NSE в умовах ГПМК, свідчить не тільки про значну величину вогнища ішемії, а й дозволяє з певною вірогідністю передбачити несприятливий прогноз для хворого (летальний кінець, значне погіршення когнітивно-мнестичних функцій, втрату адаптаційних можливостей до навколишнього середовища, тощо) [Кладова Е.А и др., 2011; Гришанова Т.Г. и др., 2011].

20

Лікувальне курсове введення тваринам з ГПМК похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу сполуки SI-86 (10 мг/кг в/ш), подібно цитиколіну (250 мг/кг в/о), супроводжувалось менш інтенсивним зростанням активності NSE. Так, через 96 год. активність ферменту зменшилась відносно групи контрольної патології відповідно у 2,6 та 2,2 разу, а через 21 добу - у 3,6 та 3,1 разу відповідно ($p < 0,05$). Така дія досліджуваних речовин, може свідчити про наявність у них цитопротекторного ефекту. Причому, в умовах гострої церебральної ішемії за здатністю зменшувати активність маркера нейродеструкції, як у гострий, так і у відновлювальний період ГПМК, терапія сполукою SI-86, по ефективності вірогідно переважає введення цитиколіну відповідно у 17,6 та 15,9 %. На нашу думку, позитивна динаміка активності NSE на тлі курсового введення сполуки SI-86 вказує на його здатність перешкоджати розвитку деструктивних змін в ішемізованому мозку, сприяти збереженню структурної цілісності нейронів, і як наслідок, зменшувати вогнище ішемії та зону пенумбри. Важливим є також те, що цитопротекторні ефекти похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу однаково проявились, як у гострому, так і у відновлювальному періоді ішемії. Отже, похідне 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу сполука SI-86 в умовах модельного геморагічного інсульту виявляє властивості як первинного, так і вторинного церебропротектора.

30

35

Приклад 25

40

Оцінка гострої токсичності

Вивчення гострої токсичності проводили при введенні сполуки SI-86 щурам у шлунок у дозах 3500 та 4000 мг/кг. Кожну дозу випробовували на 4 тваринах. Спостереження за щурами після введення досліджуваної сполуки тривало 2 тижні. Результати наведено в табл. 8.

Таблиця 8

Параметри гострої токсичності SI-86 при одноразовому введенні щурам у шлунок

Випробувані дози, мг/кг	Кількість тварин	Ефект (загинуло/усього)
3500	4	0/4
4000	4	1/4

5

Доза 3500 мг/кг не спричинила помітних відхилень у загальному стані щурів, усі тварини вижили. При збільшенні дози до 4000 мг/кг загинув 1 щур із 4 (25 %). Летальний наслідок відбувся протягом 12 год. і супроводжувався симптоматикою, яка свідчила про вплив SI-86 на ЦНС (бічне положення, порушення дихання).

10

За класифікацією Hodge та Sterner, сполуку SI-86 можна віднести до малотоксичних речовин (IV клас токсичності), оскільки її ЛД₅₀ при внутрішньошлунковому введенні знаходиться в межах 501-5000 мг/кг.

Приклад 26

Оцінка антигіпоксичної активності

15

Дані, які були отримані у ході попереднього скринінгу оригінальних похідних 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу, дозволили виявити сполуки, що проявляють достатньо високу антигіпоксичну активність на моделі ГНГГГ (табл. 9). Так, превентивне введення сполук під шифрами SI-86 та SI-108 в однаковій дозі 10 мг/кг в/ш, так само як і мексидолу (100 мг/кг в/о), вірогідно збільшувало тривалість життя щурів відносно контролю в середньому відповідно на 33,7; 28,6 та 80,2 %. Решта речовин у дозі 10 мг/кг не мали суттєвого впливу на збільшення тривалості життя тварин, що може вказувати на відсутність у них антигіпоксичної активності в умовах даного патологічного стану.

20

Таблиця 9

Вплив введення сполук SI-108, SI-86 та мексидолу на тривалість біоелектричної активності серця щурів в умовах гострої асфіксії

Умови дослід, препарати	Доза	Кількість тварин	Тривалість біоелектричної активності серця, хв	Антигіпоксична активність, %
Контроль (0,9 % розчин NaCl)	2 мл/кг в/о	15	11,6±0,7	-
SI-108	10 мг/кг в/ш	7	9,5±1,1	-18,4
SI-86	5 мг/кг в/ш	7	13,0±1,5	+ 12,1
SI-86	10 мг/кг в/ш	7	12,3±1,4	+ 5,8
SI-86	15 мг/кг в/ш	7	11,3±1,0	-2,8
Мексидол	100 мг/кг в/о	7	17,5±0,5*	+50,9

25

Дослідження антигіпоксичної активності 10 оригінальних похідних 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу проводили на моделях гострої нормобаричної гіпоксичної гіпоксії з гіперкапнією (ГНГГГ) та гострої асфіксії. ГНГГГ моделювали шляхом вміщення щурів в ізолювані гермооб'єми (0,001 м³). Спостереження тривало до моменту загибелі тварин. Антигіпоксичну активність оцінювали за тривалістю життя (у хв) відносно контролю, прийнятого за 100 %, за формулою $AA = \frac{t_d}{t_k} \times 100 \%$, де AA - антигіпоксична активність (%), t_d - час життя дослідних тварин, t_k - час життя контрольних тварин.

30

Гостру асфіксію моделювали у наркотизованих пропофолом (60 мг/кг) внутрішньоочеревинно (в/о) щурів шляхом повного перетискання трахеї при реєстрації електрокардіограми (ЕКГ). Антигіпоксичну дію оцінювали за тривалістю біоелектричної активності серця (БЕАС). Дана модель дозволяє оцінити чутливість серця до гіпоксії. Припиненням БЕАС вважали ізоелектричну лінію на ЕКГ протягом 1 хв, момент закінчення БЕАС відповідав останньому комплексу QRS на ЕКГ. Розрахунок антитоксичної активності

35

виконували за вищенаведеною формулою, вважаючи часом життя момент реєстрації останнього комплексу QRS.

Попередній скринінг досліджуваних речовин проводили на моделі ГНГГГ. Усі похідні вводили в однаковій дозі 10 мг/кг внутрішньошлунково (в/ш) за 1 год. до моделювання патологічного стану. Дію речовин, які виявились найбільш активними за результатами попереднього тестування, вивчали на моделі БЕАС. Ефективність сполуки лідера оцінювали в дозах 5; 10 та 15 мг/кг в/ш. Як референс-препарат було вибрано мексидол, який чинить антигіпоксичну дію, що поєднується з антиоксидантною та мембранопротекторною активністю та з успіхом використовується у хворих з ГПМК та ІМ. Мексидол вводили внутрішньоочередово (в/о) у дозі 100 мг/кг за аналогічною схемою.

(10) Приклад 27

Оцінка про/антиапоптотичних властивостей похідних 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу

Оцінку про/антиапоптотичних властивостей речовин проводили на інтактних щурах-самцях лінії Вістар. Досліджувані речовини вводили протягом 2-х тижнів за допомогою зонду у вигляді водної суспензії з Твіном-80 в дозі 50 мг/кг маси тіла. Знеживлення тварин проводили шляхом транслокації шийних хребців через 24 год. після початку експерименту. Ідентифікацію апоптозу клітин печінки та підшлункової залози проводили за допомогою електрофоретичного методу [75]. На електрофореграмах апоптотична фрагментація ДНК виявляється у вигляді "драбинки" із фрагментів ДНК різної довжини. Некроз клітин обумовлював "розмазаний" характер зони міграції ДНК. Смуга свічення інтактної ДНК знаходилася в районі старту.

Одним з універсальних індукторів апоптозу є окислювальний стрес, пов'язаний з реактогенними метаболітами кисню, такими, що накопичуються у клітинах при різних впливах, особливо на тлі пригнічення активності антиоксидантних систем. З огляду на ведучу роль оксидантного стресу в патогенезі інсульту доцільно було вивчити про/антиапоптотичних властивостей похідних 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу. Апоптоз може виникати і як реакція на ендогенні чинники - гормони, цитокіни, деривати арахідонові кислоти, прямі міжклітинні контакти. Більшість чинників, що викликають некроз клітин, здатні ініціювати апоптоз, якщо вони діють у малих дозах.

Останніми роками в літературі з'явилися повідомлення стосовно здатності антиоксидантів запобігати вільно-радикальному окисленню ДНК, білків хроматину і ферментів ДНК-репарації, перешкоджати загибелі клітин.

Загальновідомо, що однією з форм реакції клітини у відповідь на стресуючу дію, причиною якої можуть бути uszkodження ДНК та інших структурних елементів клітини, відсутність необхідних чинників зростання рівнів гормонів, цитокінів та ін., є активація суїцидальної програми клітини - апоптозу. Актуальність проблеми апоптозу визначається зв'язаністю порушень його регуляції з широким спектром захворювань, у тому числі цукровим діабетом 2 типу. Накопичення в клітині активних форм кисню передую апоптозу, що свідчить про істотну значущість окислювальних процесів в реалізації цього феномену.

Цей механізм, як відомо, викликається різними сигналами: зв'язуванням з рецепторами специфічних кілерних лігандів, нестачею чинників зростання/виживання, uszkodженнями ДНК і руйнуваннями цитоскелету, гіпоксією і іншими несприятливими умовами. Потім ці фрагменти зазвичай розпадаються до нуклеосом і їх олігомерів. Апоптоз - на відміну від некрозу - ніколи не супроводжується запальною реакцією, що також утрудняє його гістологічне виявлення. Конденсація хроматину характерний прояв апоптозу. Хроматин конденсується по периферії, під мембраною ядра, при цьому утворюються чітко обкреслені щільні маси різної форми і розмірів. Ядро ж може розриватися на два або декілька фрагментів. Механізм конденсації хроматину вивчений досить добре. Він обумовлений розщепленням ядерної ДНК в місцях, що зв'язують окрему нуклеосому, що призводить до розвитку великої кількості фрагментів, в яких число пар нуклеотидів ділиться на 180-200. При електрофорезі фрагменти дають характерну картину "драбинок". Ця картина відрізняється від такої при некрозі клітин, де довжина фрагментів ДНК варіює. Фрагментація ДНК в нуклеосомі відбувається під дією кальцій чутливої ендонуклеази. Ендонуклеаза в деяких клітинах знаходиться постійно (наприклад, в тимоцитах), де вона активується появою в цитоплазмі вільного кальцію, а в інших клітинах синтезується перед початком апоптозу.

Виразність прояву апоптозу оцінювали за реєстрацією фрагментів ДНК методом електрофорезу.

Оцінку про/антиапоптотичних властивостей було проведено у групах контрольних щурів та щурів, що однократно споживали наступні речовин похідних 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу: SI-86, SI-81, SI-149, SI-34, SI-180F, SI-183F, SI-73N, SI-87-6V, SI-148N, SI-108, SI-76-5T.

У групах, які отримали речовини SI-86, SI-34, апоптоз виявляється на рівні утворення високомолекулярних фрагментів завдовжки 7000-4000 п.н., що говорить про інтенсивність процесів апоптозу, властиву для здорового організму (Рис.).

У групах тварин, які отримали речовини SI-108, SI-76-5T, апоптоз верифікується за наявністю фрагментів завдовжки 2500-1500 п.н, що свідчить про посилення деградації ДНК. Тоді як у тварин, що отримали речовини SI-81, SI-149 та SI-148N, апоптоз було ідентифіковано за фрагментами завдовжки 1000-500 п.н., що доводить наявність більшого ступеню апоптозу. За умов вживання експериментальними тваринами речовин SI-180F, SI-183F, SI-173N та SI-87-6V спостерігалось максимальне, виявлене в даному дослідженні, розщеплення ДНК на фрагменти 500-200 п.н, що говорить про наявність найбільш виразних проапоптотичних властивостей вищезазначених сполук серед оцінених речовин з радикалами фтору та бром (Рис.).

Можливо вільні радикали здатні взаємодіяти як безпосередньо з азотистими основами ДНК, утворюючи їх модифіковані похідні, зокрема, 8-азагуанін, так і опосередковано, через вторинні та кінцеві продукти ПОЛ (малоновий діальдегід та його похідні), які можуть зв'язуватися з ДНК та білками ядерного хроматину, призводячи до спотворення процесів зчитування генетичної інформації - реплікації та транскрипції.

У зв'язку з цим цікаві дані щодо існування в ядерному хроматині самостійної системи переокиснення хроматин-зв'язаних ліпідів, при модифікації реакцій у яких утворюються ті ж самі вільні радикали, що безпосередньо взаємодіють з ДНК та білками хроматину, призводячи до їх ушкодження.

У щурів, що отримували речовини SI-34 та SI-86, було виявлено рівень апоптозу, близький до контрольної групи, можливо ці речовини стимулюють антиоксидантну систему захисту організму, що контролює і гальмує всі етапи вільнорадикальних реакцій, починаючи від їх ініціації і закінчуючи утворенням гідроперекисів та МДА. Основний механізм контролю цих реакцій пов'язаний з ланцюгом оборотних окисно-відновних реакцій іонів металів, глутатіону, аскорбату, токоферолу та інших речовин, значення яких особливо важливо для збереження довгоіснуючих макромолекул нуклеїнових кислот і білків, деяких складових мембран.

Приклад 28

Водний розчин сполуки SI-86 або однієї з її фармацевтично прийнятих солей отримували наступним способом. Сполуку SI-86 або одну з її фармацевтично прийнятих солей розчиняли в воді для ін'єкцій при перемішуванні без нагріву. Отриманий розчин ампулювали та стерилізували шляхом автоклавування при температурі 121 °C 15 хвилин.

Приклад 29

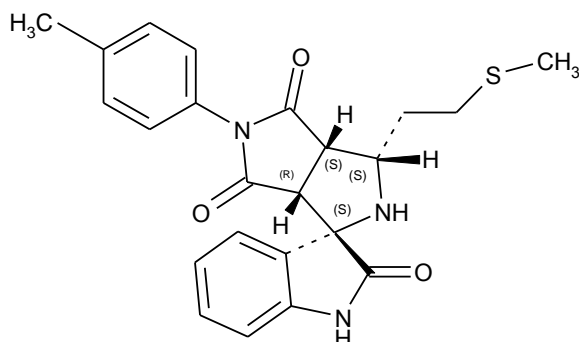
Таблетки сполуки SI-86 або однієї з її фармацевтично прийнятих солей отримували наступним способом. Сполуку SI-86 або одну з її фармацевтично прийнятих солей змішували з наповнювачем (наприклад мікрокристалічною целюлозою), розпушувачем (наприклад кроскармелозою) та опудрювачем (наприклад кальцію стеаратом). Отриману суміш перемішували протягом 20 хвилин та таблетували на таблетковому пресі зі швидкістю 75 000 одиниць за годину.

Приклад 30

Сироп сполуки SI-86 або однієї з її фармацевтично прийнятих солей отримували наступним способом. Сполуку SI-86 або одну з її фармацевтично прийнятих солей розчиняли в воді, очищеній при перемішуванні без нагріву. До отриманого розчину додавали ароматизатор, коригент смаку, консервант та згущувач. Нагрівали до температури 60 °C та перемішували протягом 30 хвилин. Отриманий сироп розливали по флаконах та укупорювали.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спіроциклічна сполука 5'-(4-метилфеніл)-3'-[2-(метилтіо)етил]-3a',6a'-дигідро-2'H-спіро[індоло-3,1'-піроло[3,4-c]пірол]-2,4',6'(1H,3'H,5'H)тріон, що має структурну формулу:



2. Спіроциклічна сполука за п. 1, де вказана сполука проявляє глюкокортикоїдомодельючу активність.

3. Спіроциклічна сполука за будь-яким з пп. 1, 2, де вказана сполука проявляє антиоксидантну, антигіпоксанти, церебропротекторну або цитопротекторну дію.

4. Застосування сполуки за будь-яким з пп. 1-3 для лікування захворювань, асоційованих з підвищеним продукуванням кортизолу.

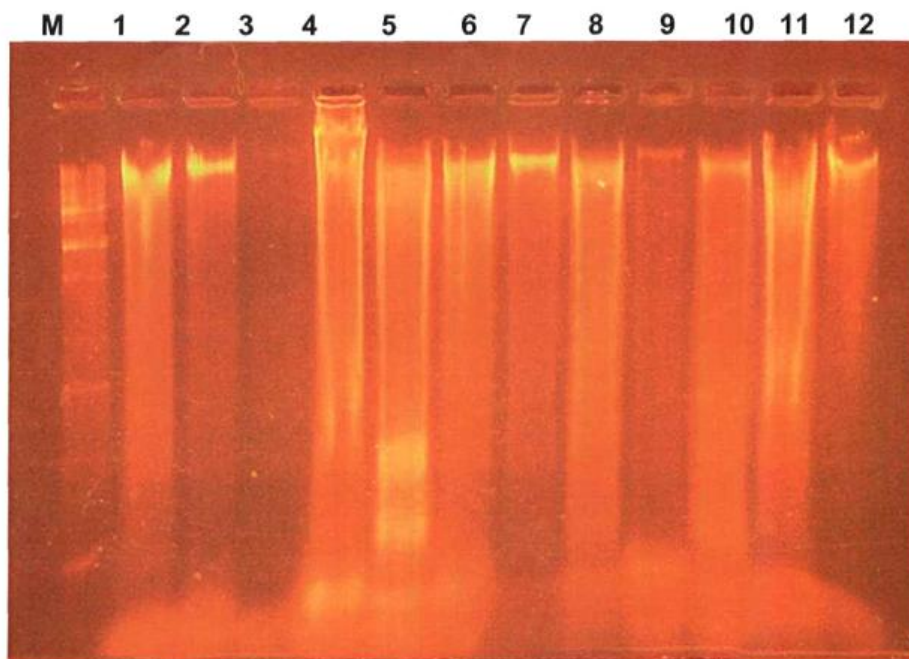
5. Застосування за п. 4, де вказане захворювання є вибраним з групи, що складається з інсульту, черепно-мозкової травми, хронічної цереброваскулярної патології, хвороби Альцгеймера, енцефалопатії, цукрового діабету, ретинодегенеративних захворювань ока, метаболічного синдрому, ожиріння, синдрому Кушинга, метаболічного синдрому Рівена, стійкості до інсуліну; гіперглікемії; гіпертензії; гіперліпідемії; когнітивних порушень; депресії; деменції; глаукоми; серцево-судинних захворювань; остеопорозу; запалення; надлишку чоловічих статевих гормонів або синдрому полікістозних яєчників (PCOS).

6. Фармацевтична композиція, що як активний агент містить сполуку за п. 1 та фармацевтично прийнятний носій.

7. Фармацевтична композиція за п. 6, де вказана композиція виконана у формі, вибраній з групи, що включає таблетки, пілюлі, порошки, пастилки, саше, суспензії, емульсії, розчини для перорального застосування, сиропи, аерозолі, дисперсії, мазі, краплі, м'які або тверді желатинові капсули, супозиторії, розчини для ін'єкцій або інфузій.

8. Фармацевтична композиція за п. 6 або 7, де вказана композиція призначена для лікування захворювання, вибраного з групи, що складається з інсульту, черепно-мозкової травми, хронічної цереброваскулярної патології, хвороби Альцгеймера, енцефалопатії, цукрового діабету, ретинодегенеративних захворювань ока, метаболічного синдрому, ожиріння, синдрому Кушинга, метаболічного синдрому Рівена, стійкості до інсуліну; гіперглікемії; гіпертензії; гіперліпідемії; когнітивних порушень; депресії; деменції; глаукоми; серцево-судинних захворювань; остеопорозу; запалення; надлишку чоловічих статевих гормонів або синдрому полікістозних яєчників (PCOS).

9. Фармацевтична композиція за п. 6 або 7, де разова доза сполуки за п. 1 складає від 0,25 до 50 мг на кг ваги тіла.



М – маркер O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder #SM1163 (від 10000 до 250 пар нуклеотидів); 3 – "інтактний контроль"; 9 – SI-86; 12 – SI-34; 7 – SI-108; 2 – SI-76-5T; 1 – SI-81; 11 – SI-148N; 8 – SI-149; 10 – SI-87-6V; 4 – SI-180F; 5 – SI-183F; 6 – SI-173N.

Рис.

Фото гелі-електрофорезу "драбинок" ДНК в клітинах печінки щурів

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601