



УКРАЇНА

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВО

(19) **UA** (11) **26459** (13) **C1**
(51)6 A 61 K 31/00, C 07 D 333/56, C 07 D 333/64

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) ІНГІБІТОР ВПЛИВУ АМІЛОЇДНИХ БІЛКІВ

1

2

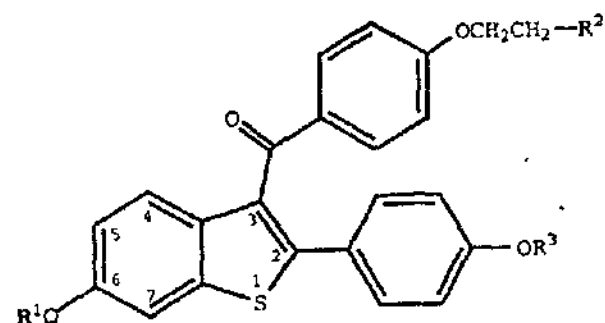
(21) 94119085
(22) 28.11.94
(24) 30.08.99
(31) 08/160.379
(32) 01.12.93
(33) US
(46) 30.08.99. Бюл. № 5
(56) 1. Seubert et al. // Nature, 1992, 359, 325-327.

2. May P.C. et al. // Journal of Neurochemistry, 1993, № 12.

(72) Ланн Уільям Генрі Уолкер (US)

(73) ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ (US)

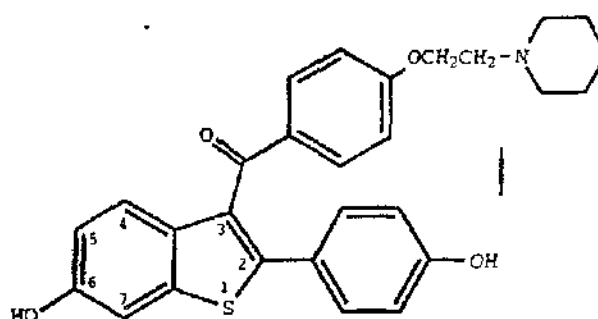
(57) 1. Применение соединения, имеющего формулу



где R¹ и R³ являются независимо водородом, -CH₃, -C(=O)-(C₁-C₆ алкил) или -C(=O)-Ar, где Ar является факультативно замещенным фенилом;

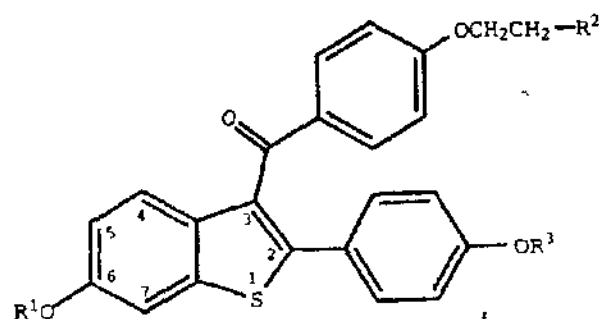
R² выбирают из группы, состоящей из пирролидино- и пиперидино-, или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, для ингибирования выработки амилоидных белков.

2 Применение по п. 1, где указанное соединение является соединением формулы



или его гидрохлоридной солью.

3. Применение соединения, имеющего формулу



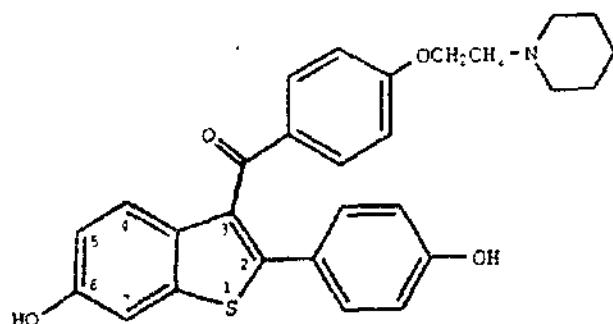
где R¹ и R³ являются независимо водородом, -CH₃, -C(=O)-(C₁-C₆ алкил) или -C(=O)-Ar, где Ar является факультативно замещенным фенилом;

R² выбирают из группы, состоящей из пирролидино- и пиперидино-, или его фармацевтически приемлемой соли или соль-

(19) **UA** (11) **26459** (13) **C1**

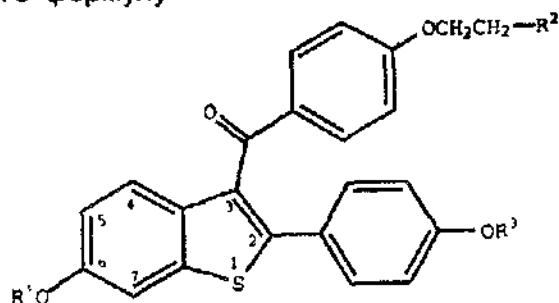
вата, для ингибирования выработки амилоидных бляшек.

4 Применение по п. 3, где указанное соединение является соединением формулы



или его гидрохлоридной солью.

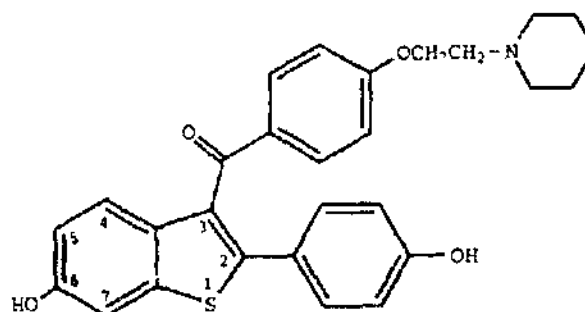
5. Применение соединения, имеющего формулу



где R^1 и R^3 являются независимо во-
дородом, $-CH_3$, $-\overset{\text{O}}{\overset{\parallel}{C}}-(C_1-C_6 \text{ алкил})$ или
 $-\overset{\text{O}}{\overset{\parallel}{C}}-Ar$, где Ar является факультатив-
но замещенным фенилом;

R^2 выбирают из группы, включающей
пирролидино- и пиперидино-, или его фар-
мацевтически приемлемой соли или соль-
вата, для ингибирования болезни Альц-
хаймера.

6. Применение по п. 5, где указанное
соединение является соединением форму-
лы



или его гидрохлоридной солью.

Болезнь Альцхаймера (Alzheimer Disease - AD) представляет собой дегенеративное мозговое расстройство, характеризующее клинически постепенной потерей памяти, познавательной способности, логического мышления, мыслительной и эмоциональной стабильности, что постепенно ведет к глубокому психическому расстройству и, в конечном счете, к смерти. AD является распространенной причиной постепенной умственной несостоятельности (слабоумия) у людей преклонного возраста и, как предполагается, представляет собой четвертую по частоте из наиболее распространенных причин смерти в Соединенных Штатах Америки. AD наблюдается у представителей различных рас и этнических групп во всем мире и представляет собой главную, в настоящем и будущем, проблему в области общественного здоровья. В настоящее время болезни, как установлено, подвержены примерно от двух до трех миллионов лиц

только в Соединенных Штатах Америки. До сих пор AD считается неизлечимой.

Мозги лиц с AD проявляют дегенерацию нейронов и характерные повреждения, в разных случаях упоминаемые как амилоидогенные бляшки, сосудистая амилоидная ангиопатия и нейрофибриллярные клубки. Большое число этих повреждений, особенно амилоидогенные бляшки и нейрофибриллярные клубки, обычно находят в нескольких областях человеческого мозга, важных для памяти и познавательной функции, у пациентов, страдающих AD. Меньшее число этих повреждений с более ограниченным анатомическим распределением находят в мозгах людей самого преклонного возраста, которые не имеют клинической AD. Амилоидогенные бляшки и сосудистая амилоидная ангиопатия также характеризует мозги лиц, страдающих трисомией 21 (синдром Дауна) или наследственным церебральным кровоотечением при амилоидозе

Датч-типа (Hereditary Cerebral Hemorrhage with Amyloidosis of the Dutch-Type - HCHWA-D). В настоящее время, окончательный диагноз AD обычно требует наблюдения упомянутых выше повреждений в ткани мозга пациентов, которые умерли от болезни или, реже, в малых образцах ткани мозга, полученных с помощью биопсии во время инвазивной нейрохирургической процедуры.

Несколько линий доказательств показывают, что постепенное отложение в головном мозге конкретных амилоидогенных белков, β -амилоидных белков (β -amyloid protein - β AP), играет основополагающую роль в патогенезе AD и может быть предшественником симптомов утраты познавательной способности спустя годы или десятилетия (см. Selkoe, 1991, Neuron, 6:487). Недавно было показано, что β AP выходит из нейронных клеток, выращиваемых в культуре, и присутствует в спинномозговой жидкости (cerebrospinal fluid - CSF) как нормальных людей, так и людей, страдающих AD (см. Seubert et al. // Nature, 1992, 359: 325-327).

В дополнение к болезни Альцхаймера и другим состояниям с амилоидогенными пептидами β AP, существуют состояния, связанные с другими амилоидогенными пептидами, которые подобны по структуре β AP, но которые не разделяют гомологической последовательности с β AP. Недавние исследования продемонстрировали функциональную взаимозаменяемость многих из этих амилоидогенных пептидов по отношению к нейротоксичности (May P.C. et al. // Journal of Neurochemistry, декабрь 1993), поданная одновременно с данной заявкой (U. S. Patent Application 08/109, 782, зарегистрированная 19 августа 1993, Docket X-9342).

Несмотря на прогресс, полученный в понимании фундаментальных механизмов AD и других болезней, связанных с амилоидогенными белками, остается необходимость разработки композиций и способов лечения этих болезней. Способы лечения должны, преимущественно, быть основаны на лекарствах, которые дают возможность ингибирования дегенерации или действия амилоидогенных белков.

Данное изобретение указывает способы для ингибирования физиологического расстройства, связанного с амилоидогенными белками, каковой способ включает назначение человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения формулы

5

10

15

20

25

30

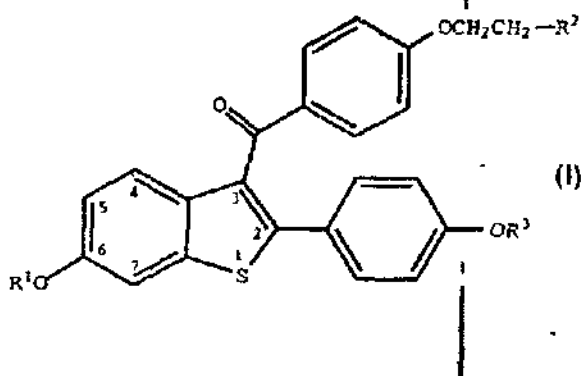
35

40

45

50

55



где R^1 и R^3 являются, независимо водородом $-CH_3$, $-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}- (C_1-C_8\text{-алкил})$ или $-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-Ar$,

где Ar является необязательно замещенным фенилом;

R^2 выбирают из группы, содержащей пирролидино-, гексаметиленамино- и пиперидино-, или их фармацевтически приемлемую соль или сольват.

Данное изобретение также предусматривает способ ингибирования выработки амилоидогенного белка, включающий назначение человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения формулы (I).

Данное изобретение также предусматривает способ ингибирования осаждения амилоидных бляшек, включающий назначение человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения формулы (I).

Данное изобретение предусматривает также способ ингибирования болезни Альцхаймера (AD), включающий назначение человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения формулы (I).

Рассматриваемое изобретение относится к открытию, что выделенная группа бензотиофенов, которые соответствуют формуле (I), являются пригодными для использования при ингибировании действия амилоидогенных белков, и, в частности, к соединениям, ингибирующим образование амилоидогенных белков.

Изобретение указывает использования, осуществляемые путем назначения человеку, нуждающемуся в этом, дозы соединения формулы (I), или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, эффективной для ингибирования физиологического расстройства, связанного с амилоидогенными белками, и, предпочтительно, с β -амилоидными белками

Термин "ингибировать" включает его общепринятое значение, которое включает препятствование, предотвращение, ограничение и замедление, приостановку или обращение хода развития, тяжести или конечных симптомов. Как таковые, способы включают как терапевтическое, так и профилактическое назначение.

Термин "физиологическое расстройство, связанное с амилоидогенным белком" включает болезни, связанные с несвойственным или нежелательным отложением, таким как в мозгу, в печени, в почках или другом органе, по крайней мере, одного из амилоидогенных белков, и в качестве таковой включает AD (включая часто встречающуюся в роду AD), синдром Дауна, HCHWA-D, продвинутое старение мозга и им подобные.

Термин "эффективное количество" означает количество соединения, которое необходимо для ингибирования физиологических воздействий или расстройств, связанных с амилоидогенным белком, или для ингибирования производства или осаждения, амилоидогенных белков, или для ингибирования болезни Альцгеймера, если это случится.

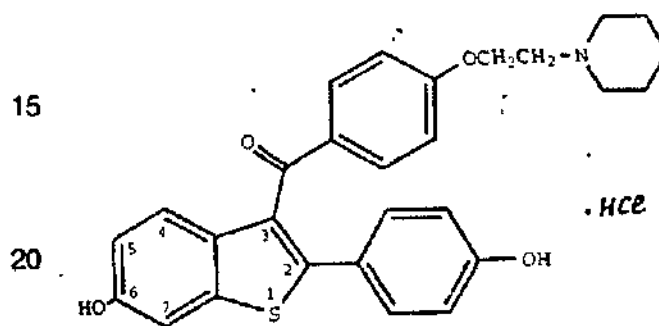
Термин "амилоидогенный белок", как он здесь используется, относится и к тем пептидам, которые имеют способность к самопроизвольному объединению в более высоко упорядоченные агрегаты и, возможно, собираться в амилоидные бляшки. Предпочтительными целевыми β -амилоидогенными белками являются β -амилоидные белки.

Как правило, соединения приготавливают вместе с распространенными наполнителями, разбавителями или носителями и прессуют в таблетки или приготавливают в виде эликсиров или растворов для удобного орального употребления, или вводят внутримышечным или внутривенным путем. Соединения могут быть введены трансдермально, и могут быть приготовлены в виде дозированной формы с задержкой выхода, и им подобных.

Соединения, используемые в способах рассматриваемого изобретения, могут быть получены согласно установленным и аналогичным процедурам, таким как подробно описанные в Патентах США № 4133814, 4418068 и 4380635, которые все включены сюда путем упоминания. Как правило, процесс начинают с бензо(b)тиофена, имеющего 6-гидроксильную группу и 2-(4-гидроксифенильную) группу. Исходное соединение блокируют, алкилируют и деблокируют, получая соединение формулы (I). Примеры получения

таких соединений предусмотрены в патентах США, обсужденных выше, и в примерах данной заявки. Необязательно замещенный фенил включает фенил или фенил, замещенный одно- или двукратно C_1-C_8 алкилом, C_1-C_4 алкокси, гидроксигруппой, нитро, хлор, фтор или три(хлор или фтор)метилом.

Включенным в данное изобретение является соединение ралоксифен



Соединения, используемые в способах данного изобретения, образуют фармацевтически приемлемые дополнительные соли кислот и оснований с большим количеством органических и неорганических кислот и оснований, и включают физиологически приемлемые соли, которые часто используются в фармацевтической химии. Такие соли также являются частью данного изобретения. Типичные неорганические кислоты, используемые для образования таких солей, включают соляную, бромистоводородную, йодистоводородную, азотную, серную, фосфорную, фосфорноватую и им подобные. Соли, производные от органических кислот, таких как алифатическая моно- и дикарбоновая кислота, фенилзамещенная алкановая кислота, гидроксиалкановая и гидроксипентандионная кислота, ароматическая карбоновая кислота, алифатическая и ароматическая сульфоновая кислота также могут быть использованы. Такие фармацевтически приемлемые соли, таким образом, включают ацетат, фенилацетат, трифторацетат, акрилат, аскорбат, бензоат, хлорбензоат, динитробензоат, гидроксibenzoат, метоксибензоат, метилбензоат, о-ацетоксибензоат, нафталин-2-бензоат, бромид, изобутират, фенилбутират, β -гидроксипентан-3-ол, бутин-1,4-диоат, гексин-1,4-диоат, каприлат, хлорид, циннамат, цитрат, формиат, фумарат, гликолат, гептансат, гиппурат, лактат, малат, малеат, гидроксималеат, малонат, манделат, метилсалицилат, никотинат, изоникотинат, нитрат, ок-

салат, фталат, тетрафталат, фосфат, моногидрофосфат, дигидрофосфат, метафосфат, пирофосфат, пропионат, пропионат, фенилпропионат, салицилат, себакат, сукцинат, суберат, сульфат, бисульфат, пиросульфат, сульфит, бисульфит, сульфонат, бензолсульфонат, р-бромфенилсульфонат, хлорбензолсульфонат, этансульфонат, 2-гидроксиэтансульфонат, метансульфонат, нафталин-1-сульфонат, нафталин-2-сульфонат, р-толуолсульфонат, ксилосульфат, тарtrat и им подобные. Предпочтительной солью является гидрохлоридная соль.

Дополнительные фармацевтически приемлемые соли, как правило, образуются путем реакции соединения формулы (I) с эквимоллярным или избыточным количеством кислоты. Реагирующие вещества, как правило, объединяют в общем растворителе, таком как диэтиловый эфир или бензол. Обычно соль выпадает в осадок из раствора за время примерно от 1 ч до 10 дней и может изолирована путем фильтрования или растворитель может быть снят обычными средствами.

Основания, повсеместно используемые для получения солей, включают гидроксид аммония, гидроксиды и карбонаты щелочных и щелочноземельных металлов, так же как и алифатические и ароматические амины, алифатические диамины гидроксисалкиламины. Основания, особенно пригодные для использования при получении дополнительных солей, включает гидроксид аммония, карбонат калия, бикарбонат натрия, гидроксид кальция, метиламин, диэтиламин, циклогексиламин и этаноламин.

Фармацевтически приемлемые соли, как правило, имеют повышенные характеристики растворимости по сравнению с соединениями, от которых они являются производными, и, таким образом, являются часто более податливыми для приготовления в виде жидкостей или эмульсий.

Фармацевтические препараты могут быть приготовлены с помощью процедур, известных по литературе. Например, соединения могут быть приготовлены с распространенными наполнителями, разбавителями или носителями, сформированы в таблетки, капсулы, суспензии, порошки и так далее. Примеры наполнителей, разбавителей и носителей, которые являются пригодными для таких препаратов, включают следующие: наполнители и начинка, такие как крахмал, сахар, маннитол и кремнивые производные: вяжущие вещества, такие как карбоксиметилцеллюлоза и

другие производные целлюлозы, альгинаты, желатин и поливинилпирролидон, увлажняющие вещества, такие как глицерол, дезинтегрирующие вещества, такие как агар-агар, карбонат кальция и бикарбонат натрия, вещества для замедления растворения, такие как парафин, ускорители повторной адсорбции, такие как продукты замещения аммония, поверхностно-активные вещества, такие как этиловый спирт, глицеролмоностеарат, адсорбционные носители, такие как коалин и бентонит, смазки, такие как тальк, стеарат кальция и магния, и твердые полиэтиленгликоли.

Соединения также могут быть приготовлены в виде эликсиров или растворов для удобного орального приема, или в виде растворов, пригодных для парентерального введения, например, внутримышечным, подкожным или внутривенным путем. Дополнительно, соединения являются очень удобными для дозированных форм с задержкой выхода и им подобных. Препараты могут быть так составлены, что они выпускают активный ингредиент только или предпочтительно в конкретной части кишечного тракта, возможно, после заданного периода времени. Покрывания, оболочки и защитные матрицы могут быть сделаны, например, из полимерных веществ или парафина.

Соединения формулы (I) могут быть назначены для профилактического и/или терапевтического лечения болезней, связанных с отложением одного или более амилоидогенных белков, таких как болезнь Альцхаймера, синдром Дауна и далеко зашедшее старение мозга. В терапевтических приложениях объединения назначают людям, уже страдающим от болезни. Соединения назначают в количествах, достаточных для ингибирования физиологических воздействий или расстройств, связанных с амилоидогенным белком, особенно, с β -амилоидными белками.

Для профилактических применений соединения формулы (I) назначают людям, предрасположенным к болезни, связанной с амилоидогенными белками, предпочтительно, к болезни Альцхаймера, но не страдающим еще от такой болезни. Такие люди могут быть определены путем генетического скрининга и клинического анализа, как описано в медицинской литературе. (Goate), Nature, 1991, 349; 704-706). Соединения будут ингибировать бляшки амилоидных белков на симптоматически ранней стадии, предпочтительно, предотвращая даже начальные

стадии болезни, связанной с амилоидогенными белками. Предпочтительную группу для получения соединений изобретения, либо для профилактических либо для терапевтических целей, составляют женщины постклимактерического периода.

Конкретная дозировка соединения формулы (I) по данному изобретению зависит от тяжести состояния, способа введения и связанных с этим факторов, что решается наблюдающим врачом. Как правило, принимаемые и эффективные дозы будут находиться в пределах примерно от 0,1 до 1000 мг/день, а более типично, примерно от 5 до 200 мг/день. Такие дозировки назначаются субъектам, нуждающимся в лечении, от одного до, примерно, трех раз каждый день, или более часто, если это необходимо, в течение периода времени, достаточного для ингибирования болезни или расстройства.

Часто является желательным или необходимым ввести фармацевтические композиции непосредственно или опосредованно в мозг. Прямые методы, обычно, включают размещение катетера для доставки лекарства в систему желудочков для шунтирования рематознцезалического барьера. Опосредствованные методы, которые, как правило, являются предпочтительными, включают приготовление композиций для обеспечения временной дезактивации действия лекарств путем преобразования гидрофильных лекарств в липидо-растворимые лекарства. Временная дезактивация, как правило, достигается с помощью блокировки гидроксильных, карбоксильных или первичных аминогрупп, присутствующих в лекарстве, для того, чтобы сделать лекарство более липидо-растворимым и податливым для транспортировки через рематознцезалический барьер. Альтернативно, доставка гидрофильных лекарств может быть интенсифицирована путем внутриартериального вливания гипертонических растворов, которые могут на время открыть рематознцезалический барьер.

Как правило, является предпочтительным введение соединения формулы (I) в виде дополнительной кислой соли, как это является обычным при введении медикаментов, имеющих основную группу, такую как пиперидиновое кольцо. Для таких целей имеются в распоряжении следующие формы дозировки.

В препаратах, которые следуют далее, "активный ингредиент" обозначает соединение формулы (I)

Препарат 1. Желатиновые капсулы.

Тверды желатиновые капсулы приготавливают, используя следующее:

5	Ингредиент	Количество, мг/капсула
	Активный ингредиент	0,1-1000
	Крахмал	0-650
10	Сыпучий порошок крахмала	0-650
	Силиконовая жидкость (350 сСт)	0-15

15 Ингредиенты смешивают, просеивают через сито № 45 меш и наполняют ими твердые желатиновые капсулы.

20 Примеры конкретных препаратов соединения ралоксифена в капсулах, которые получают, включают те, что представлены ниже.

Препарат 2. Капсулы ралоксифена.

25	Ингредиент	Количество, мг/капсула
	Ралоксифен	1
	Крахмал	112
30	Сыпучий порошок крахмала	225,3
	Силиконовая жидкость (350 сСт)	1,7

35 Препарат 3. Капсулы ралоксифена.

40	Ингредиент	Количество, мг/капсула
	Ралоксифен	5
	Крахмал	108
	Сыпучий порошок крахмала	225,3
45	Силиконовая жидкость (350 сСт)	1,7

50 Препарат 4. Капсула ралоксифена

55	Ингредиент	Количество, мг/капсула
	Ралоксифен	10
	Крахмал	103
	Сыпучий порошок крахмала	225,3
	Силиконовая жидкость (350 сСт)	1,7

Препарат 5. Капсула ралоксифена.

Ингредиент	Количество, мг/капсула
Ралоксифен	50
Крахмал	150
Сыпучий порошок крахмала	397
Силиконовая жидкость (350 cSt)	3,0

Конкретные препараты, представленные выше, могут быть изменены в согласии с предусмотренными разумными вариациями.

Препараты в виде таблеток приготавливают с использованием ингредиентов, представленных ниже.

Препарат 6. Таблетки.

Ингредиент	Количество, мг/таблетка
Активный ингредиент	0,1–1000
Целлюлоза микрокристаллическая	0–650
Двуокись кремния, микрочастицы	0–650
Стеариновая кислота	0–15

Компоненты смешивают и прессуют в форме таблеток.

Альтернативно таблетки, содержащие каждая 0,1–1000 мг активного ингредиента, производят следующим образом.

Препарат 7. Таблетки.

Ингредиент	Количество, мг/таблетка
Активный ингредиент	0,1–1000
Крахмал	45
Целлюлоза микрокристаллическая	35
Поливинилпирролидон (в виде 10% раствора в воде)	4
Натрийкарбоксиметилцеллюлоза	4,5
Стеарат магния	0,5
Тальк	1

Активный ингредиент, крахмал и целлюлозу просеивают через сито № 45 меш и тщательно перемешивают. Раствор поливинилпирролидона смешивают с полученными в результате порошками, кото-

рые затем пропускают через сито № 14 меш. Гранулы, полученные таким образом, сушат при 50–60°C и просеивают через сито № 18 меш. Натрийкарбоксиметилцеллюлозу, крахмал, стеарат магния и тальк, просеивая сначала через сито № 60 меш, затем добавляя к гранулам, которые после перемешивания прессуют в машине для производства таблеток, получая таблетки.

Суспензии, содержащие 0,1–1000 мг медикамента на дозу в 5 мл каждая, получают следующим образом.

Препарат 8. Суспензии.

Ингредиент	Количество, мг/5 мл
Активный ингредиент	0,1–1000 мг
Натрийкарбоксиметилцеллюлоза	50 мг
Сироп	1,25 мг
Раствор бензойной кислоты	0,10 мл
Отдушка	Произв. кол-во
Краситель	Произв. кол-во
Очищенная вода	До 5 мл

Медикамент пропускают через сито № 45 меш и смешивают с натрийкарбоксиметилцеллюлозой и сиропом для получения однородной мягкой пасты. Раствор бензойной кислоты, отдушку и краситель разбавляют некоторым количеством воды и добавляют перемешивая. Затем добавляют достаточное для получения требуемого объема количество воды.

Условия эксперимента.

Для испытаний от 1 до 3 обеспечиваются следующие условия эксперимента.

Амилины могут быть приобретены у Bachem, Inc. (Torrance, California, USA), Peninsuls Laboratories, Inc. (Belmont, California, USA), Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA) или могут быть синтезированы как описано ниже. Амилоид - β (1–40) (Lot # ZK052) и пептид обратного β -амилоида (40–1) (Lot # ZX299) могут быть приобретены из Bachem Inc. β -микроглобулин может быть приобретен у Sigma Chemicals (St. Louis, Missouri, USA).

Основные растворы пептидов (1 мМ) являются свежеприготовленными в пиролитически чистой воде и их разбавляют до указанных концентраций в определенных культурных средах. Культуры клеток гиппокампа крысы (10–14 дней in vitro) обрабатывают пептидами или лекарствен-

ной средой в течение 4 дней. Жизнеспособность культуры кортикальных клеток крысы наблюдают визуально с помощью фазово-контрастной микроскопии и количественно оценивают путем измерения (концентрации) лактадегидрогеназы (lactate dehydrogenase -- LDH) поступающей в культурную среду.

Культуры кортикальных клеток человека (12–22 дня *in vitro*) обрабатывают пептидами или лекарственной средой в течение 3 дней. Жизнеспособность клеток оценивают визуально с помощью фазово-контрастной микроскопии и количественно оценивают по уменьшению (концентрации) тетразолийной соли ХТТ.

Специалисты могут понять, что жизнеспособность клеток и, следовательно, токсичность могут быть измерены с использованием других методов, таких как мониторинг уровня кальция. Методики измерения LDM и ХТТ, также как и испытания с мониторингом уровня кальция, описаны ниже.

Испытание 1.

Испытание нейротоксичности с измерением уровня кальция.

Аликвоту кортикальных клеток ED 18 высевают в покрытые полиэтиленмином чашки для культуры ткани в течение 3–5 дней *in vitro* перед обработкой 25 мкМ раствором β -амилоидного пептида, либо свежерастворенного (в основном, в конформационном состоянии "клубок"), либо состаренного (7 дней, в основном, в β -складчатой конформации). Это испытание на нейротоксичность проводят с химически определенной DEME (среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко), с HEPES-буфером и с подпиткой фетальной телячьей сывороткой.

После инкубации в течение двух дней с β -амилоидным пептидом определяют подъем концентрации цитосомного кальция (Ca^{+2}) после введения импульса глутамата, используя флуоресцентный краситель, чувствительный к кальцию (Wahl J., et al. // *Journal of Neurochemistry*, 1989, 53:1316). Подъем внутриклеточных уровней Ca^{+2} подвергает риску целостность клеток. Все вышеупомянутое повторяют, однако, с соединением данного изобретения. Активность соединения иллюстрируется уменьшением внутриклеточных уровней Ca^{+2} по сравнению с первой серией опытов.

Испытание 2.

Испытание нейротоксичности с измерением ХТТ.

Аликвоту кортикальных клеток ED 18 высевают в покрытые полиэтиленмином

чашки для культуры тканей в течение 3–5 дней *in vitro* перед обработкой 25 мкМ раствором β -амилоидного пептида, либо свежерастворенного (в основном, в конформационном состоянии "клубок"), либо состаренного (7 дней, в основном, в β -складчатой конформации). Это испытание проводят с химически определенной DEME с HEPES-буфером и с подпиткой фетальной телячьей сывороткой.

Эти клетки инкубируют в течение от 3 до 5 дней *in vitro* перед обработкой 25 мкМ раствором β -амилоидного пептида, либо свежерастворенного (в основном, в конформационном состоянии "клубок"), либо состаренного (7 дней, в основном, в β -складчатой конформации). После двух дней инкубации жизнеспособность клеток наблюдается путем измерения уменьшения (концентрации) тетразолийной соли ХТТ [2,3-бис(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолин-5 карбоксианилидная внутренняя соль], как описано Rochm N. et al. // *Journal of Immunological Methods*, 1992, 142; 257. Вышеуказанное повторяют вновь, однако с соединением данного изобретения. Активность соединения иллюстрируется увеличением жизнеспособности клеток по сравнению с первой серией опытов.

Испытание 3.

Испытание нейротоксичности с измерением.

Лактадегидрогеназу (LDH) измеряют в 20 мкл аликвотах кондиционированной определенной DEME с использованием стандартного кинетического испытания LDH на длине волны 340 нм (Sigma Catalog Number # 228–20) в формате с 96 лунками. Испытания производят при 37°C в управляемом персональным компьютером планшет-ридере EL 340 Microplate Biokinetics (Bio-tek Instruments) с использованием программного обеспечения Delta Soft 11 (v. 3. 30B, Bio Metallics, Inc) для обработки данных. Стандарты контроля качества, содержащие нормальные и повышенные уровни сывороточной LDH (например, Sigma Enzyme Controls 2N и 2E), используют в каждом испытании. Соединение данного изобретения добавляют при различных концентрациях к порциям в лунках. Результаты выражают в виде единиц LDH/L, где L-единица определяется как количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль никотинамидаденинового динуклеотида в минуту при условиях испытания. Активность индуцируется с помощью уменьшения уровней индикатора нейротоксичности по сравнению с контролем.

Испытание 4.

Клетки, инфицированные УУ:99 или УУ:42, которые способны образовывать амилоидные образования (как описано в WO 91/04339, опубликованном 4 апреля 1991 года), помещают на микротитровальный планшет с 96 лунками. Для осуществления соответствующих разбавлений и добавлений используют автоматическую пипетку для введения соединения формулы (I), которое нужно испытывать, в клетки. Ряд концентраций соединения инкубируют в инкубаторе культур тканей (или предварительно инкубируют) с клетками при 37°C в течение заранее заданного периода времени, или альтернативно в течение от 3 до 72 ч.

Следом за инкубацией, культурную среду удаляют и клетки приготавливают для измерения пре-амилоидов следующим образом. Клетки фиксируют для иммуноцитохимической окраски с антителами к амилоидам. Первичные антитела вводят с последующей инкубацией с мечеными вторичными антителами, и измеряют уровень связывания между первичными и вторичными антителами, используя планшет-ридер EL ISA для регистрации оптической плотности меченых антител. Меньшая регистрируемая оптическая плотность, по сравнению с контрольным образцом, клеток, выращенных в отсутствие испытываемого лекарства, показывает на способность этого лекарства ингибировать отложение амилоидов. Эта процедура может быть модифицирована, чтобы сделать возможным детектирование обратного растворения пре-амилоидов с использованием коррелятивного ферментного маркера. Активность соединения формулы (I) иллюстрируется с помощью уменьшения изме-

ренных (концентраций) пре-амилоидов по сравнению с контролем.

Испытание 5.

От пяти до пятидесяти женщин выбирают для клинических испытаний. Женщины находятся в постклимактерическом возрасте, то есть, у них прекратились менструации за 6–12 месяцев до начала исследований, у них был поставлен диагноз – ранняя стадия болезни Альцгеймера (AD) в период испытаний, но, в остальном, общее состояние их здоровья хорошее. В исследованиях принимает участие контрольная группа с плацебо, т.е. женщин разделили на две группы, одна из которых получала активное вещество данного изобретения, а вторая получала плацебо. Пациенты тестируются на память, познавательную способность, логическое мышление и другие симптомы, связанные с AD. Женщины из тестирующей группы получают 50–200 мг активного вещества в день путем орального приема. Они продолжают это терапевтическое лечение в течение 6–36 месяцев. Поддерживают аккуратную регистрацию тестируемых симптомов в обеих группах и в конце испытаний эти результаты сравнивают. Результаты сравнивают как между членами каждой группы, так и результаты каждого пациента сравнивают с симптомами, зарегистрированными у каждого пациента перед началом испытаний. Активность испытываемого лекарства иллюстрируется с помощью ингибирования какого-либо одного или более симптомов AD у пациентов, принимавших испытываемое лекарство.

Полезность соединений формулы (I) доказывается с помощью активности в по крайней мере одном из приведенных выше испытаний.

Упорядник

Техред М. Келемеш

Коректор О.Обручар

Замовлення 508

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101

