



УКРАЇНА

(19) UA (11) 87982 (13) C2

(51) МПК

A61K 31/454 (2006.01)

A61K 31/4166 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

A61P 25/18 (2006.01)

A61P 25/22 (2006.01)

A61P 25/24 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ АБО ЗАПОБІГАННЯ РОЗЛАДІВ ЦЕНТРАЛЬНОЇ НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ ПОХІДНИМИ 1-АР(АЛК)-4-ПІПЕРИДИНОІМІДАЗОЛІН-2-ОНУ, ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ

1

2

(21) a200600251

(22) 28.06.2004

(24) 10.09.2009

(86) PCT/EP2004/006989, 28.06.2004

(31) 60/486,678

(32) 11.07.2003

(33) US

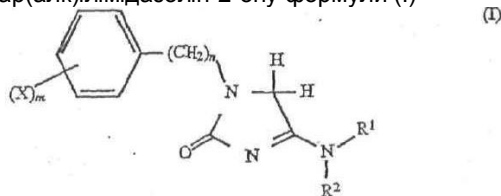
(46) 10.09.2009, Бюл.№ 17, 2009 р.

(72) ЛЯНГЕН БАРБАРА, DE, РУНФЕЛЬДТ КРІС,
DE, ДОСТ РІТА, DE, ЛЮДДЕНС ХАРТМУТ, DE,
РАБЕ ХОЛЬГЕР, DE(73) БЕРІНГЕР ІНГЕЛЬХАЙМ ВЕТМЕДІКА ГМБХ,
DE

(56) WO 97/09314 A, 13.03.1997

US 5 994 347 A, 30.11.1999

WO 03/024968 A, 27.03.2003

ROSTOCK ET AL: "AWD 131-138 as anxiolytic
anticonvulsant" DRUGS OF THE FUTURE,
BARCELONA, ES, vol. 23, no. 3, 1998, pages 253-
255SIGEL ET AL: "The antiepileptic drug AWD 131-138
stimulates different recombinant isoforms of the
GABAA receptor through the benzodiazepine binding
site" NEUROSCIENCE LETTERS, LIMERICK, IE, vol.
245, no. 2, 3 April 1998 (1998-04-03), pages 85-88(57) 1. Спосіб лікування або запобігання розладу
центральної нервової системи, який являє собою
афективний розлад чи афективний епізод або три-
вожний розлад чи тривожний епізод, шляхом вве-
дення пацієнту, який цього потребує, ефективної
кількості щонайменше одного 1-
ар(алк)ілімідазолін-2-ону формули (I)де Х - водень, С₁₋₄-алкіл, С₁₋₄-алкоксильна група,
трифторметил або галогеновий залишок, R¹ і R²,
незалежно один від одного є С₁₋₄-алкільним, С₃₋₁₀-
циклоалкільним або С₃₋₁₀-гетероалкільним залиш-
ком, або R¹ і R² спільно є С₂₋₆-алкіленовим залиш-
ком, в якому група -CH₂ факультативно замінена
киснем, азотом або сіркою, n - 0 або 1 і m - 0 або
ціле число від 1 до 5,вибраного з 1-(4-метоксифеніл)-4-
піперидиноімідазолін-2-ону та 1-(4-хлорфеніл)-4-
піперидиноімідазолін-2-ону.2. Спосіб за п.1, який відрізняється тим, що вво-
дять ефективну кількість 1-(4-хлорфеніл)-4-
піперидиноімідазолін-2-ону.3. Спосіб за п.1 або п.2, який відрізняється тим,
що згадану сполуку вводять парентеральним або
пероральним шляхом.4. Спосіб за будь-яким із пп.1-3, який відрізняєть-
ся тим, що згадану сполуку вводять у кількості 1-
100 мг на кг маси тіла хворого.5. Спосіб за будь-яким із пп.1-4, який відрізняєть-
ся тим, що розладом центральної нервової систе-
ми є афективний розлад або афективний епізод.6. Спосіб за п.5, який відрізняється тим, що афе-
ктивним розладом або афективним епізодом є
клінічна депресія, тяжкий депресивний розлад або
епізод, епізоди маніакального, змінного та гіпома-
ніакального настрою, депресивні епізоди з атипо-
вими, кататонічними або меланхолічними проява-
ми, депресивні епізоди з передменструальним
дисфорійним розладом, який виникає у післяполо-
говий період, легкий депресивний розлад, пост-
травматичний стресовий розлад, obsесивно-
компульсивний розлад і розлади харчування.7. Спосіб за будь-яким із пп.1-4, який відрізняєть-
ся тим, що розладом центральної нервової систе-
ми є тривожний розлад або тривожний епізод.8. Спосіб за п.7, який відрізняється тим, що три-
вожним розладом або епізодом є хронічний три-
вожний розлад, панічний розлад, агорафобія, спе-

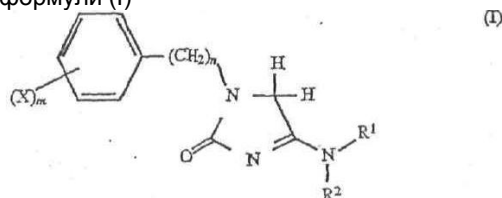
(13) C2

(11) 87982

(19) UA

цифічна фобія, соціальна фобія та генералізований тривожний розлад.

9. Фармацевтична композиція для лікування або запобігання розладу центральної нервової системи, який являє собою афективний розлад чи афективний епізод або тривожний розлад чи тривожний епізод, яка містить ефективну кількість щонайменше одного 1-ар(алк)ілімідазолін-2-ону формули (I)



де X - водень, C₁₋₄-алкїл, C₁₋₄-алкоксильна група, трифторметил або галогеновий залишок, R¹ і R², незалежно один від одного є C₁₋₄-алкільним, C₃₋₁₀-циклоалкільним або C₃₋₁₀-гетероалкільним залишком, або R¹ і R² спільно є C₂₋₆-алкіленовим залишком, в якому група -CH₂ факультативно замінена киснем, азотом або сіркою, n - 0 або 1 і m - 0 або ціле число від 1 до 5,

вибраного з 1-(4-метоксифеніл)-4-піперидиноімідазолін-2-ону та 1-(4-хлорфеніл)-4-піперидиноімідазолін-2-ону.

10. Фармацевтична композиція за п.9, яка **відрізняється** тим, що сполукою формули (I) є 1-(4-хлорфеніл)-4-піперидиноімідазолін-2-он.

11. Фармацевтична композиція за будь-яким із пп.9, 10, яка **відрізняється** тим, що згадана композиція додатково містить наповнювачі або допоміжні речовини.

12. Фармацевтична композиція за будь-яким із пп.9-11 для парентерального або перорального введення.

13. Фармацевтична композиція за п.9, яка **відрізняється** тим, що згадана композиція містить 1-100 мг на кг маси тіла хворого сполуки формули (I).

14. Фармацевтична композиція за будь-яким із пп.9-13, де розладом центральної нервової системи є афективний розлад або афективний епізод.

15. Фармацевтична композиція за п.14, де афективним розладом або афективним епізодом є клінічна депресія, тяжкий депресивний розлад або епізод, епізоди маніакального, змінного та гіпоманіакального настрою, депресивні епізоди з атиповими, кататонічними або меланхолічними проявами, депресивні епізоди з передменструальним дисфорійним розладом, який виникає у післяпологовий період, легкий депресивний розлад, посттравматичний стресовий розлад, obsесивно-компульсивний розлад і розлади харчування.

16. Фармацевтична композиція за будь-яким із пп.9-13, де розладом центральної нервової системи є тривожний розлад або тривожний епізод.

17. Фармацевтична композиція за п.16, де тривожним розладом або епізодом є хронічний тривожний розлад, панічний розлад, агорафобія, специфічна фобія, соціальна фобія та генералізований тривожний розлад.

Цей винахід має відношення до застосування 1-ар(алк)ілімідазолін-2-онів, що містять двозаміщений радикал аміну у 4 положенні, для лікування або запобігання розладів центральної нервової системи, у тому числі психотичних розладів і, зокрема, шизофренії, депресії, тривоги, дистонії, і до застосування цих та інших агоністичних речовин, які являють собою субтипово-селективні ліганди рецепторів бензодіазепінів, що містять субодиноцю альфа 3.

Розлади центральної нервової системи є тяжкими психічними розладами, які надзвичайно погіршують повсякденне життя. Наприклад, шизофренія, на яку страждає приблизно 1% населення світу (Капуано (Capuano) та інші, 2002), найчастіше розпочинається до тридцятирічного віку, що означає лікування впродовж усього життя (Бенес (Benes), 1993).

Психоз, зокрема шизофренія, має гетерогенну симптоматичну картину (American Psychiatric Association, 1994). Симптоми можуть розподілятися на дві частини. У разі шизофренії, домінуючими на гострій стадії є галюцинації (сенсорне сприйняття за відсутності зовнішнього стимулу) і марення (хибні, нав'язливі та незвичні ідеї), наприклад, манія переслідування. Хворий є надзвичайно збудженим і втрачає контакт із реальністю. Ці симптоми називають позитивними (Девідсон (Davidson), Ніл (Neale), 1988; Бейлер (Bailer) та інші, 1999). Після того як стадія збудження посла-

блюється, стають очевидними так звані негативні симптоми. Ці симптоми включають порушення пізнавальної здатності, зниження активності центральної нервової системи, розлад пам'яті і розуміння мови, швидкості мовлення, рухової функції, робочої пам'яті, а також байдужість і апатичність. Хворі знаходяться у стані невпевненості та тривоги (Девідсон (Davidson), Ніл (Neale), 1988; Бейлер (Bailer) та інші, 1999).

Незважаючи на доступність декількох антипсихотичних лікарських засобів, сучасна терапія психозів не є задовільною. Класичні антипсихотичні засоби з високою спорідненістю до рецептора допаміну D₂, викликають тяжкі рухові розлади і мають седативні побічні ефекти (Найберг (Nyberg) та інші, 2002). Найвідомішим прототипом класичних антипсихотичних засобів, який все ще залишається лікарським засобом першого ряду, є галоперидол (Капуано (Capuano) та інші, 2002). Через те, що цей препарат має негативні побічні ефекти і може послаблювати гострі позитивні, але не негативні симптоми шизофренії, він не надає хворому можливості повернення до повсякденного життя.

Цей факт обумовив розробку нових, так званих атипових, антипсихотичних препаратів. Вони демонструють знижену спорідненість до рецептора допаміну D₂ і більш розмаїтий профіль рецепторної спорідненості, зосереджуючись на рецепторі серотоніну субтипу 5-HT₂ (Сейва (Sawa),

Снайдер (Snyder), 2002). Зміна профілю рецепторної спорідненості цих лікарських засобів зменшила прояв побічного ефекту у вигляді рухових розладів, однак призвела до зсуву побічних ефектів до таких проблем, як надзвичайно швидкий приріст маси тіла, порушення у статевій сфері, порушення пізнавальних функцій і втрата почуття задоволення. Клозапін (clozapine), який відіграє роль базового лікарського засобу, що поліпшує як позитивні, так і негативні симптоми шизофренії і є позбавленим побічних ефектів у вигляді рухових розладів, викликає агранулоцитоз, що є головним, потенційно летальним, побічним ефектом цього лікарського засобу (Капуано (Capuano) та інші, 2002). Передусім, однак, все ще залишається велика кількість випадків, які не виліковуються (Лінденмайєр (Lindenmayer) та інші, 2002). Ні причина шизофренії, ні механізм дії антипсихотичних лікарських засобів, зокрема, атипсових антипсихотичних лікарських засобів, повністю не встановлені. Існує, як видається, полігенний тип успадкування, який, окрім того, керується негенетичними факторами (Прасад (Prasad) та інші, 2002). Все більш зростаючий обсяг епідеміологічних, генетичних та клінічних нейробіологічних даних вказує на те, що у патофізіології шизофренії вирішальну роль відіграють аномалії розвитку головного мозку (Арнольд (Arnold), 1999).

Головна гіпотеза щодо шизофренії базується на порушенні функціонування допамінергічної системи. Так, гострі психотичні симптоми можуть стимулюватись допамінергічними лікарськими засобами (Капуано (Capuano) та інші, 2002) і, як описувалось вище, класичні антипсихотичні лікарські засоби, наприклад, галоперидол (haloperidol), мають високу спорідненість до рецептора допаміну D2 (Найберг (Nyberg), 2002). Спосіб дії атипсових антипсихотичних засобів вказує, однак, на існування додаткових нейромедіаторних систем, залучених до розвитку шизофренії. Клозапін, базовий антипсихотичний лікарський засіб, і єдиний, що поліпшує позитивні і негативні симптоми шизофренії, не виявляє високої спорідненості до рецепторів допаміну D2 (Герлах (Gerlaeh), 2002). Наприклад, іншим нейромедіатором, залученим до патофізіології шизофренії, є серотонін (Сейва (Sawa), Снайдер (Snyder), 2002).

До розвитку шизофренії залученою видається також глутаматергічна нейромедіаторна система. Так, антагоністи NMDA (N-метил-D-аспартат), наприклад, фенциклідин (phencyclidine) і кетамін (ketamine), можуть стимулювати симптоми шизофренії у людей і гризунів (Абі-Сааб (Abi-Saab) та інші, 1998; Лахті (Lahti) та інші, 2001). Перевага модельних тварин, що застосовувались для імітації психозу на основі антагоністів NMDA, у протилежність допамінергічним моделям, полягає у тому, що вони не тільки імітують збуджену та імпульсивну поведінку позитивної фази шизофренії, але також і негативні симптоми шизофренії, наприклад, порушення пізнавальної здатності (Абі-Сааб (Abi-Saab) та інші, 1998; Йєнтш (Jentsch), Рот (Roth), 1999). Завдяки цьому, ця модель може застосовуватись для ідентифікації нових лікарських засобів з антипсихотичним потенціалом.

Незважаючи на те, що причина більшості розладів центральної нервової системи є ще далекою від розуміння, було встановлено, однак, що важливу роль у багатьох розладах центральної нервової системи відіграє нейромедіатор серотонін (5-HT). Хоча складні емоційні стани, наприклад, депресивний та тривожний стани, не можуть бути зведені виключно до дисбалансу, що викликається одним нейромедіатором, підтверджується, однак, що однією з головних причин розвитку депресії та тривоги є розлади нейромедіаторної системи 5-HT (Греф (Graeff) та інші, 1996).

Так, незалежно від різноманітних клінічних форм депресії, а саме тяжкого депресивного розладу та епізодів, епізодів маніакального, змінного та гіпоманіакального настрою, депресивних епізодів з атипсовими, кататонічними або меланхолічними проявами, депресивних епізодів з передменструальним дисфорійним розладом, який виникає у післяпологовий період, легкого депресивного розладу, посттравматичного і гострого стресового розладу, хворі у стані депресії демонструють значне зниження рівнів 5-HT у цереброспінальній рідині і додаткові зміни у центральній системі 5-HT (Оуенс (Owens) Немероф (Nemeroff), 1994). Незважаючи на те, що першопричинний механізм депресії є, безсумнівно, більш складним, ніж просте зниження рівнів 5-HT або ослаблення функціонування цієї системи (Дельгадо (Delgado), Морено (Moreno), 1999), участь серотонінергічної системи у депресії найбільш наглядно демонструється терапевтичною ефективністю лікарських засобів, що підвищують позаклітинну концентрацію 5-HT у головному мозку, наприклад, селективних інгібіторів повторного поглинання серотоніну (SSRI). Так, SSRI, наприклад, флуоксетин (fluoxetine) або циталопрам (citalopram), є, як описують, ефективними при лікуванні депресії різних підгруп, у тому числі тяжкого депресивного розладу, обсесивно-компульсивного розладу і розладів харчування (Стоке (Stokes), Гольц (Holtz), 1997). Важливо звернути увагу на те, що селективні інгібітори повторного поглинання серотоніну розглядалися як значне досягнення у лікуванні розладів центральної нервової системи, порівняно з неселективними інгібіторами поглинання моноаміну, які одночасно різною мірою підвищують рівні серотоніну, допаміну і норадреналіну і, відповідно до цього, демонструють більшу кількість побічних ефектів.

На додаток до цього, довготривале підвищення рівнів позаклітинної концентрації 5-HT у головному мозку за допомогою, наприклад, селективних інгібіторів повторного поглинання серотоніну, може послаблювати тривогу у тварин і людей (Джоунз (Jones) та інші, 2002; Стоке (Stokes), Гольц (Holtz), 1997). Так, флуоксетин, селективний інгібітор повторного поглинання серотоніну, що застосовується для лікування різних тривожних розладів (Натт (Nutt) та інші, 1999), демонструє додатковий ефект модуляції підвищених рівнів 5-HT у разі панічного розладу, агорафобії, специфічної фобії, соціальної фобії та генералізованого тривожного розладу. Стає зрозумілим, що фармакологічний ефект опосередковується підвищеними рівнями нейромедіаторів, наслідком чого є підви-

щена активація відповідного рецептора, а не специфічним блокуванням медіатора поглинання. Однак пізня поява ознак анкіолітичного і антидепресивного ефекту сполук, що підвищують рівень 5-НТ у головному мозку, наприклад, селективних інгібіторів повторного поглинання серотоніну, є обмежувальним фактором терапевтичної корисності цих лікарських засобів (Натт (Nutt) та інші, 1999). Людина, що знаходиться у напруженому емоційному стані на межі скоєння самогубства, не може очікувати впродовж трьох тижнів, доки проявиться антидепресивний, антипсихотичний та/або анкіолітичний ефект цього лікарського засобу.

У протилежність до SSRI, бензодіазепіни демонструють швидку появу ознак своєї анкіолітичної активності (Коста (Costa), Гідотті (Guidotti), 1996). Діапазон їх терапевтичного застосування обмежується, однак, відносно коротким періодом часу, оскільки можливість їх постійного застосування обмежується розвитком толерантності до дії бензодіазепінів і ризиком виникнення звикання до надмірного вживання лікарських засобів (Коста (Costa), Гідотті (Guidotti), 1996).

Таким чином, лікарський засіб, що об'єднує обидва механізми, а саме швидку появу ознак активності бензодіазепінів і ефективність тривалого застосування SSRI, виявився б великим досягненням при лікуванні тривожних розладів, а також депресії.

Іншим варіантом розладу центральної нервової системи є дистонія. Дистонія являє собою руховий розлад, основу якого становить порушення функції центральної нервової системи щодо регулювання рухової активності; раніше цей розлад був відомим також під назвою "психовегетативний синдром". Цей розлад характеризується мимовільними, повторними рухами і аномальними положеннями тіла, частково у поєднанні з болісними м'язовими судорогами (Грін (Green), 1992; Фрідман (Friedman), Стандерт (Standaert), 2001; Гаманн (Hamann), Ріхтер (Richter), 2002). Симптоми, у залежності від підтипу дистонії, коливаються від вогнищевих до генералізованих дистонічних нападів. Існують також прогресуючі форми, що розпочинаються вогнищевими нападами у дитинстві. Уражаються можуть люди будь-якого віку. У Німеччині знаходиться приблизно 80000 людей, що страждають на дистонічні напади (DDGeV, 2002).

На основі розподілу симптомів, дистонія може класифікуватись на декілька підтипів: вогнищеві дистонії, багатовогнищеві або сегментні дистонії, торсіонні дистонії, півкульні, генералізовані або пізні дистонії. До вогнищевих дистоній належать цервікальна дистонія (кривошия), блефароспазм (мимовільне скорочення повік), апендикулярна дистонія (судоми кінцівок, наприклад, писальна спазма), оромандибулярна дистонія і спастична дисфонія (спазма голосових зв'язок) (DDGeV, 2002; Фрідман (Friedman), Стандерт (Standaert), 2001).

На сучасному етапі, за винятком декількох рідкісних форм, лікування дистонії зосереджується на симптоматичному лікуванні. Вогнищеві дистонії можуть доволі успішно лікуватись ботулотоксином (Хсюнг-І. (Hsiung G.Y.) та інші, 2002). Ботулоток-

син, який вводять локально до ураженої ділянки, викликає кількотижневе розслаблення м'язів. Лікування слід проводити регулярно. Слабким місцем цього лікування є те, що у деяких хворих розвивається стійкість до токсину унаслідок появи антитіл проти нього, і токсин не може застосовуватись у разі ураження великих ділянок тіла (Дресслер (Dressier) та інші, 2002; Хсюнг (Hsiung) та інші 2002).

Системна фармакотерапія сегментних і генералізованих дистоній є незадовільною. Вона залучає застосування антихолінергічних лікарських засобів і баклофену (baclofen), пресинаптично діючого агоніста ГАМКв, який, за повідомленнями, благотворно впливає на симптоми дистонії (Фан (Fahn), 1987; Грін (Green), 1992; Равідкі (Rawicki), 1999). Ефект антиконвульсивних лікарських засобів у разі дистонії є суперечливим: фенобарбітал (phenobarbital) і ламотригін (lamotrigine), як видається, мають продистонічний ефект, у той час як габапентин (gabapentin), як гадають, є антидистонічним (Ріхнер (Richner), Льюшер (Loscher), 1999; Ріхнер (Richner), Льюшер (Loscher), 2000; Сіп (Siep) та інші, 2002).

Хірургічне лікування (глибока стимуляція білої кулі головного мозку) у разі тяжкої дистонії все ще знаходиться на найранішій стадії розвитку та удосконалення, і успішно застосовується лише при певних типах дистонії. У більшості випадків необхідною є додаткова, системна фармакотерапія (Крек (Krack), Веркей (Vercueil), 2001; Веркей (Vercueil) та інші, 2002; Клейн (Klein), Озеліус (Ozelius), 2002).

Механізм дистонії повністю не вивчено. Існує багато свідчень про порушення функціонування базальних ядер (Гернерт (Gernert) та інші, 2002; Герреро (Herrero) та інші, 2002). Гадають, що порушується функціонування механізму, що координує інформацію соматосенсорних аферентних нервів і пропускає сигнали до опорно-рухового апарату (Герреро (Herrero) та інші, 2002). Дистонія може спричинюватись травмою головного мозку або інсультом, однак приблизно 80% генералізованих дистоній є ідіопатичними і, як видається, успадковуються з різним ступенем прояву (Полз (Pauls), Корчін (Korczy), 1990). На цей час на генетичній основі розрізняють 13 різних форм дистонії (дистонія типів 1-13) (Клейн (Klein), Озеліус (Ozelius), 2002). Генна мутація ідентифікована для трьох рідких підтипів генералізованих дистоній, наприклад, для типу, що реагує на L-ДОФА (Тягараян (Thyagarajan), 2001).

Хом'яки, як генетична модель пароксизмальної дистонії, є однією з декількох чітко визначених тваринних моделей дистонії (Хамман (Hamann), Ріхтер (Richter), 2002).

Тривожні розлади є широко розповсюдженими, і їх кількість зростає у всьому світі. Бензодіазепіни все ще вважаються найефективнішими лікарськими засобами для лікування тривожних розладів і демонструють швидку появу ознак анкіолітичної активності. Ці препарати, однак, демонструють також небажані побічні ефекти, наприклад, атаксію, седативний ефект, розслаблення скелетних м'язів, амнезію, що викликається взає-

модією етанолу та барбітурату. Серйозними проблемами є також розвиток толерантності до терапевтичних ефектів цих лікарських засобів та потенціал розвитку токсикоманії (Коста (Costa), Гідотті (Guidotti), 1996; Аттот (Atack), 2003).

Як згадувалось вище, класом лікарських засобів, які застосовуються для лікування тривожного розладу є селективні інгібітори повторного поглинання серотоніну (SSRI). Ці лікарські засоби є добре відомими як антидепресанти і не викликають суттєвих побічних ефектів бензодіазепінів, наприклад, толерантності або токсикоманії, однак обмежувальним фактором їх терапевтичної корисності є пізня поява ознак їхнього анкіолітичного і антидепресивного ефекту (Натт (Nutt) та інші, 1999). Окрім того, на їх терапевтичне застосування впливає приріст маси тіла і порушення статевих функцій, що примушує хворих припиняти лікування (Перна (Perna) та інші, 2001). Об'єднання позитивних ефектів обох лікарських засобів, лігандів рецептора бензодіазепінів і селективних інгібіторів повторного поглинання серотоніну, могло б послужити матрицею для ідеального антифобійного седативного засобу. На завершення, все ще існує сильна потреба у антифобійному седативному засобі.

Однією зі спроб ослаблення цих головних побічних ефектів лікарських речовин, що зв'язуються із сайтом розпізнавання бензодіазепінів на рецепторі ГАМК_A, зокрема, седативного ефекту, була б розробка лікарських засобів із високою селективністю щодо певних субтипів рецептора ГАМК_A (Коста (Costa), Гідотті (Guidotti), 1996). Фармакологічні та генетичні дослідження, проведені впродовж останніх років, дозволили виявити різні α -субодиниці рецепторів, що несуть відповідальність за різні поведінкові симптоми, індуковані бензодіазепінами (Аттот (Atack), 2003).

Так, за описом, рецептори, що містять субодиниці альфа 1, опосередковують седативний та антиконвульсивний ефект бензодіазепінів (Коста (Costa), Гідотті (Guidotti), 1996; Крестані (Crestani) та інші, 2000; Дубінські (Dubinsky) та інші, 2002). Рецептори ГАМК_A, що містять субодиниці альфа 5, повинні відігравати роль у амнезії, що індукується бензодіазепінами, у той час як рецептори, що містять субодиниці альфа 2 і альфа 3, за результатами спостереження, несуть відповідальність за анкіолітичну активність сполук цього класу (Коста (Costa), Гідотті (Guidotti), 1996; Лоу (Low) та інші, 2000; Дубінські (Dubinsky) та інші, 2002). Однак ефекти бензодіазепінів, специфічні для субтипів, ще не є повністю зрозумілими, і зараз точиться суперечливе обговорення ролі різних субодиниць, яке додатково ускладнюється повідомленням про існування, окрім різних альфа-субодиниць, різних бета-, гамма-субодиниць, а також додаткових субодиниць, які додають свій внесок до різноманітності. Деякі дані вказують на те, що седативний ефект бензодіазепінів, наприклад, опосередковується не виключно рецепторним субтипом, що містить субодиницю альфа 1, але і додатковими механізмами, і що субодиниці альфа-1 відіграють переважну роль лише при атаксії (Платт (Platt) та інші, 2002). Таубер (Tauber) та інші (2003) встановили, що

втрата випрямного рефлексу унаслідок одночасного введення діазепаму і етанолу (у поєднанні з втратою рецепторної активності), у мишей, мутантних по субодиниці альфа 2, не спостерігається, але втрата рухової активності (ознака седативного ефекту), спричинена введенням обох сполук, спостерігалась у мишей, мутантних по субодиницям альфа 1, альфа 2, альфа 3 і альфа 5. Відсутність знань щодо функціонування різних субтипів рецептора бензодіазепінів, які гетерогенно експресуються у головному мозку, спричинюється, головним чином, відсутністю лігандів із високою селективністю щодо різних субтипів.

Однак, виходячи з вищезгаданих даних, одержаних на основі генетично модифікованих мишей з поставленими під сумнів альфа-субодиницями, нездатними до подальшого опосередковування ефекту бензодіазепінів, декілька фірм розпочали науково-дослідні програми, спрямовані на розробку лігандів рецептора бензодіазепінів, селективних щодо субодиниць альфа 2 і альфа 3, зі зниженою активністю відносно субодиниці альфа 1 (Лоу (Low), 2000; Грібел (Griebel), 2001). Описано декілька сполук цього типу, однак ступінь субтипової селективності видається доволі обмеженим. Функціональна селективність забезпечується різним ступенем часткового агонізму відносно окремих рецепторів. Було показано, наприклад, що сполука SL651498 демонструє приблизно 40-50% часткову агоністичну активність відносно рецепторів, що містять субодиниці альфа 1 і альфа 5, з одночасною 100% частковою агоністичною активністю відносно рецепторів, що містять субодиницю альфа 2, і 70% активністю відносно рецепторів, що містять субодиницю альфа 3. Наслідком цього дійсно може бути функціональна субтипова селективність, однак лише для фармакологічних ефектів, що потребують високого ступеню активації рецепторів. У разі ефектів, що потребують активації нижчої за 50%, такі сполуки будуть діяти подібно неселективним агоністам, як видно на Фіг.2 у роботі Грібел (Griebel) та інші (2001). Все ще триває обговорення того, який ступінь активації рецептора є необхідним для якого ефекту, але було встановлено, що навіть часткові неселективні агоністи, наприклад, імідазенил (imidazenil), демонструють у хворих седативний ефект (Аттот (Atack), 2003). Залишається, таким чином, сумнівним, чи забезпечить стратегія функціонального часткового агонізму гадану селективність з виключенням субодиниці альфа 1. Незважаючи на цей факт, інші дослідники вдаються до такого самого підходу (Доусон (Dawson), 1998; Маккернан (McKernan), 1998). NS2710 і нерозкрита нова сполука, що піддається клінічній розробці, які були одержані унаслідок досліджень і програми розробки фірми Merck (Adis Data Information, 2003; Гудейкр (Goodacre) та інші, 2002; Чемберс (Chambers) та інші, 2001) ще не продемонстрували очікуваного клінічного профілю і виявились седативними і не позбавленими потенціалу звикання (Аттот (Atack), 2003). Підсумовуючі ці результати, до сього часу не було досягнуто суттєвого прогресу у розробці нових лігандів рецептора бензодіазепінів, зокрема, з високою субтиповою селективністю. На додаток до цього,

знання щодо ролі різних субодиноць у фізіології та патофізіології захворювань все ще залишаються дуже обмеженими, і, знову ж таки, унаслідок відсутності селективних сполук.

У той час як визначення ролі субодиноць альфа 1 і альфа 2 було цілком щонайменше деяких досліджень, ще менше відомо відносно субодиноці альфа 3, яка являє собою субодиноцю з достатньо вибірковою розподілом у головному мозку. До цього часу немає доступних лігандів із будь-якою селективністю щодо субодиноці альфа 3. Усі вищезгадані лікарські засоби розроблялись для того, щоб вони мали, і вони такі мають, у кращому разі деяку, селективність щодо субодиноці альфа 2 у комбінації із субодиноцею альфа 3, з виключенням, до певної міри, субодиноці альфа 1. Існує усього декілька досліджень відносно рецептора, що містить субодиноцю альфа 3. У імуногістохімічному дослідженні субодиноця альфа 3 описується як така, що у великій кількості експресується у холінергічних нейронах смугастого тіла, перегородки, смуги білої речовини, що з'єднує різні частини мозку, і у допамінергічних нейронах щільної частини чорної речовини головного мозку, у той час як ці клітини експресують лише незначну кількість субодиноць альфа 2 (Родрігес-Пальарес (Rodriguez-Pallares) та інші, 2001). Видається, що субодиноці альфа 3 на допамінергічних нейронах щільної частини чорної речовини супроводжуються, головним чином, субодиноцями альфа 4 (субодиноця альфа 4 є нечутливою до бензодіазепінів), у той час як мРНК субодиноць альфа 2 виявлено не було (Гайон (Guyon) та інші, 1999). Норадренергічні нейрони locus coeruleus, за описом, є імунореактивними відносно субодиноць альфа 3 і альфа 2. Усі ці ділянки головного мозку були імунонегативними відносно субодиноць альфа 1 (Родрігес-Пальарес (Rodriguez-Pallares) та інші, 2001).

Подібним чином, серотонінергічні нейрони лінії зрощення демонструють високий рівень мічення субодиноць альфа 3, у той час як там спостерігається лише декілька нейронів, що експресують субодиноцю альфа 2 (Родрігес-Пальарес (Rodriguez-Pallares) та інші, 2001). На додаток до цього, Гао (Gao) та інші (1993) встановили, що переважна більшість серотонінергічних нейронів лінії зрощення демонструє сильну імунореактивність відносно субодиноці альфа 3, але вони не мають забарвлення субодиноці альфа 1, у той час як у ГАМКергічних нейронах лінії зрощення присутні обидві субодиноці. Усі ці дослідження, однак, являють собою дослідження з міченням, і вони не дають можливості одержання скільки-небудь чіткої фармакологічної картини, опосередкованої субодиноцею альфа 3.

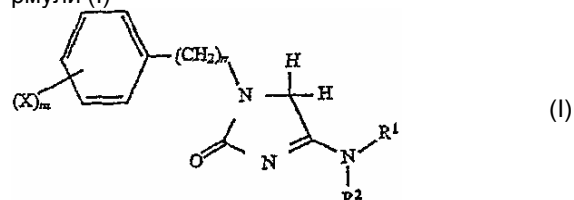
У разі місцевого введення мусцимолу (muscimol), агоніста ГАМК_A, і бікукулліну (bicuculline), антагоніста ГАМК_A, у дорсальній і медіальній частині лінії зрощення, за допомогою мікродіалізу виявили вплив на позаклітинні рівні 5-HT (місцево і у прилеглому ядрі) (Тао (Tao). Ауербач (Auerbach), 2000). Це вказує на те, що рецептори ГАМК_A, що містять субодиноцю альфа 3, можуть

бути залученими до серотонінергічної передачі нервових імпульсів.

Виходячи з вищенаведеного, стає зрозумілим, що сучасні способи і можливості лікування розладів центральної нервової системи, у тому числі психотичних розладів, депресії, тривожних розладів і рухових розладів, наприклад, дистонії, є недостатніми, і вони принаймні частково демонструють тяжкі побічні ефекти.

Таким чином, мета цього винаходу полягала у наданні додаткових можливостей лікування або запобігання таких розладів центральної нервової системи у ссавців і, зокрема, у наданні способів лікування для застосування на людях.

За першим аспектом цього винаходу, ця мета була досягнута способом лікування або запобігання розладів центральної нервової системи, у тому числі, психотичних розладів, депресії, тривожних розладів і рухових розладів та/або психотичних симптомів, пов'язаних з іншими психічними розладами, шляхом введення ефективного кількості щонайменше одного 1-ар(алк)ілімідазолін-2-ону формули (I)



де X - водень, C₁₋₄-алкіл, C₁₋₄-алкоксильна група, трифторметил або галогеновий залишок, R¹ і R², незалежно один від одного, є C₁₋₄-алкільним, C₃₋₁₀-циклоалкільним або C₃₋₁₀-гетероалкільним залишком, або R¹ і R² разом є C₂₋₆-алкіленовим залишком, де група -CH₂ факультативно заміщена киснем, азотом або сіркою, n - 0 або 1, m - 0 або ціле число від 1 до 5, хворому, який цього потребує.

За цим винаходом, з подивом було встановлено, що сполуки формули I є високоефективними щодо лікування наведених нижче розладів центральної нервової системи:

1. Психози і психотичні епізоди:

Різні типи шизофренії (наприклад, параноїдна, гебефренічна, кататонічна недиференційована або резидуальна) і біполярні афективні розлади, наприклад, біполярна депресія і постпсихотичні депресивні розлади шизофренії. Психотичні епізоди, що спостерігаються у разі шизофреноподібних розладів, шизоафективні розлади, маревні розлади, психотичні розлади, обумовлені дією певних речовин (наприклад, алкоголю, амфетаміну, гашишу, кокаїну, галюциногенів, лікарських засобів для інгаляції (легких препаратів), опіоїдів або феніклідину); зміни особистості (наприклад, пограничні зміни особистості), імпульсивні розлади, наприклад, неадекватна агресивність; біполярні розлади, гіперактивність з дефіцитом уваги (AD/HD), зловживання і залежність від певних речовин (наприклад, хронічний алкоголізм, залежність від амфетаміну, кокаїну або опіатів).

2. Афективні розлади і афективні епізоди

Клінічна депресія, тяжкий депресивний розлад і епізоди, епізоди маніакального, змінного та гіпо-

маніакального настрою, депресивні епізоди з атиповими, кататонічними або меланхолічними проявами, депресивні епізоди з передменструальним дисфорійним розладом, який виникає у післяпологовий період, легкий депресивний розлад, посттравматичний стресовий розлад, obsесивно-компульсивний розлад і розлади харчування (порушення поведінки харчування).

3. Тривожні розлади і тривожні епізоди

Хронічний тривожний розлад, панічний розлад, агорафобія, специфічна фобія, соціальна фобія та генералізований тривожний розлад.

4. Рухові розлади, пов'язані, головним чином, із порушенням функціонування базальних ядер

Різні підтипи дистонії, наприклад, вогнищеві дистонії, багатовогнищеві або сегментні дистонії, торсіонна дистонія, пікульні, генералізовані або пізні дистонії (індуковані психофармакологічними лікарськими засобами). До вогнищевих дистоній належать цервікальна дистонія (кривошия), блефароспазм (мимовільне скорочення повік), апендикулярна дистонія (судоми кінцівок, наприклад, писальна спазма), оромандибулярна дистонія, спастична дисфонія (спазма голосових зв'язок) і пароксизмальна дистонія.

Вперше сполуки формули (I) були описані у WO 97/09314 як речовини, придатні для лікування епілептичних розладів. Зараз із подивом встановлено, що ці речовини можуть також застосовуватись для ефективного лікування або попередження розладів центральної нервової системи, наприклад, вищезгаданих розладів, однак без обмеження ними. Згадані сполуки можуть застосовуватись для лікування ссавців і, зокрема, для лікування людей.

Кількість груп $-CH_2-$ у сполуках, що застосовуються за цим винаходом, дорівнює 0 (1-арилімідазолін-2-он) або 1 (1-аралкілімідазолін-2-он). Прикладами сполук формули (I) є:

- 1-феніл-4-морфоліноімідазолін-2-он,
- 1-(4-метокси)-4-піперидиноімідазолін-2-он,
- 1-(4-хлорфеніл)-4-морфоліноімідазолін-2-он,
- 1-(4-хлорфеніл)-4-піперидиноімідазолін-2-он,
- 1-(4-хлорфеніл)-4-диметиламіноімідазолін-2-он,
- 1-(4-бромфеніл)-4-морфоліноімідазолін-2-он,
- 1-(3-хлорфеніл)-4-морфоліноімідазолін-2-он,
- 1-(4-хлорфеніл)-4-гексаметиленімідазолін-2-он,
- 1-(4-метилфеніл)-4-морфоліноімідазолін-2-он,
- 1-(4-хлорфеніл)-4-

- (циклогексилметиламіно)імідазолін-2-он,
- 1-(4-фторфеніл)-4-морфоліноімідазолін-2-он,
- 1-бензил-4-морфоліноімідазолін-2-он.

Речовини, що застосовуються за способом за цим винаходом, можна одержати способом, опис якого наведено у патенті США №5,869,481.

Сполукою для застосування як лікарський засіб за цим винаходом, якій віддають особливу перевагу, є 1-(4-хлорфеніл)-4-піперидиноімідазолін-2-он (ELB139; номенклатура IB: 1-(4-хлорфеніл)-4-піперидин-1-іл-2,5-дигідро-1H-імідазолін-2-он).

Введення щонайменше однієї сполуки формули (I) і, зокрема, 1-(4-хлорфеніл)-4-піперидиноімідазолін-2-ону, може здійснюватись

звичайним шляхом введення психоактивних лікарських засобів.

Згадані сполуки, за варіантом, якому віддають перевагу, вводять у формі фармакологічної композиції у кількості 1-100 мг на кг маси тіла хворого на добу. У разі вибору інгаляційного або інтраназального шляху введення, кількість для введення, якій віддають перевагу, становить 0,05-5 мг на кг маси тіла хворого. Для застосування у рамках лікування шизофренії та інших психотичних розладів, більшу перевагу віддають введенню 2-70 мг на кг маси тіла хворого, і особливу перевагу віддають введенню 5-50 мг на кг маси тіла хворого, у той час як у рамках лікування дистонії більшу перевагу віддають введенню 1-20 мг на кг маси тіла хворого і особливу перевагу віддають введенню 5-15 мг на кг маси тіла хворого.

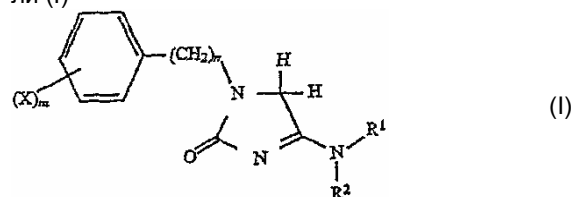
За варіантом, якому віддають перевагу, сполуки вводять пероральним шляхом або шляхом ін'єкції у формі відповідної парентеральної композиції, шляхом інгаляції, інтраназальним шляхом або у формі супозиторію.

На додаток до цього, згадані сполуки, за варіантом, якому віддають перевагу, застосовують у комбінації зі звичайними фармацевтичними носіями, наповнювачами або допоміжними речовинами. Форми застосування у рамках цього винаходу не є критичними доти, доки гарантується достатня абсорбція активного інгредієнта.

На додаток до цього, згадані сполуки вводять як єдиний лікувальний засіб для описаних хвороб і стадій хвороб або у комбінації з іншими сполуками, придатними для лікування згаданих хвороб або стадій хвороб. Комбінація може являти собою одночасне введення із застосуванням окремих шляхів введення для кожного лікарського засобу або у формі встановленої комбінації у вигляді суміші зі звичайними фармацевтичними наповнювачами або допоміжними речовинами. Форми застосування комбінацій у рамках цього винаходу не є критичними доти, доки гарантується достатня абсорбція активного інгредієнта.

Наведені нижче приклади застосування 1-ар(алк)ілімідазолін-2-онів за цим винаходом ясно показують, що способи за цим винаходом є надзвичайно ефективними у разі лікування психотичних захворювань, практично без спостереження побічних ефектів. Сполуки, застосовані за цим винаходом, дуже добре переносяться і можуть легко вводитись до складу композицій для терапевтичного або профілактичного застосування.

Додатковим об'єктом цього винаходу є, таким чином, фармацевтична композиція для лікування або профілактики розладів центральної нервової системи, що містить ефективну кількість щонайменше одного 1-ар(алк)ілімідазолін-2-ону формули (I)



де X - водень, C₁₋₄-алкіл, C₁₋₄-алкоксильна група, трифторметил або галогеновий залишок, R¹ і R², незалежно один від одного, є C₁₋₄-алкільним, C₃₋₁₀-циклоалкільним або C₃₋₁₀-гетероалкільним залишком, або R¹ і R² разом є C₂₋₆-алкіленовим залишком, де група -CH₂ факультативно заміщена киснем, азотом або сіркою, n - 0 або 1, m - 0 або ціле число від 1 до 5, у хворого, який цього потребує.

За варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, фармацевтична композиція містить 1-(4-хлорфеніл)-4-піперидиноімідазолін-2-он (ELB139) як активний агент.

Фармацевтична композиція за цим винаходом додатково може містити придатні наповнювачі, допоміжні речовини або заповнювачі та/або речовини, що є необхідними або корисними для одержання відповідної форми застосування. Фармацевтична композиція за цим винаходом містить активний(-і) інгредієнт(-и), за варіантом, якому віддають перевагу, у кількості 1-100мг/кг маси тіла хворого, і призначена для введення per os або парентеральним шляхом (наприклад, внутрішньовенно, внутрішньом'язово або підшкірно).

За варіантом, якому віддають більшу перевагу, композиція містить активний інгредієнт у кількості 25-70мг на кг маси тіла або 5-15мг на кг маси тіла відповідно, у залежності від можливого застосування.

За додатковим аспектом цього винаходу, ціль було досягнуто шляхом надання способу лікування або запобігання хвороб центральної нервової системи, у тому числі психотичних розладів, рухових розладів та/або психотичних симптомів, пов'язаних з іншими психічними розладами і, зокрема, лікування тривожних розладів. Згаданий спосіб включає введення ефективної кількості щонайменше однієї речовини, яка являє собою субтипово-селективний агоніст рецепторів бензодіазепінів, що містять субодиноцю альфа 3, яка, однак, не є активною, тобто вона не виявляє значного позитивного ГАМК-підсилювального впливу на рецептори, що містять субодиноцю альфа 2 та/або альфа 4 рецептора ГАМК, незалежно від того, зв'язується вона з цим рецептором або ні.

Можна очікувати, що ліганди рецепторів бензодіазепінів, селективні щодо субодиноцю альфа 3 згаданих рецепторів, можуть бути ефективними для лікування вищезгаданих захворювань центральної нервової системи.

За цим винаходом, селективність визначається як щонайменше 20-кратна різниця у концентрації, необхідній для викликання 50% максимальної ГАМК-потенціювальної реакції, як показано у наведеному у цьому описі розділу прикладів і способів, тобто щонайменше 20-кратна різниця у EC₅₀. Селективність може також визначатись як щонайменше 20-кратна різниця у зв'язувальній спорідненості (спорідненість, щонайменше у 20 разів вища спорідненості, визначеної за допомогою стандартних експериментальних методик визначення спорідненості), якщо спорідненість переводити у функціональний агоністичний вплив на відповідний субтип рецептора. Особливу перевагу віддають сполукам, що є субтипово-селективними відносно

рецепторів, що несуть субодиноцю альфа 3 рецептора ГАМК. Перевагу віддають також сполукам, селективним щодо субтипу альфа 3, які повністю позбавлені активності (які не виявляють значного позитивного ГАМК-посилювального ефекту) відносно рецепторів, що несуть субодиноцю альфа 2 або альфа 4 рецептора ГАМК, незалежно від того, зв'язуються вони з цим рецептором або ні. Особливу перевагу віддають також таким сполукам, якщо вони демонструють вищезгадані особливості і, на додаток до цього, діють як часткові агоністи рецепторів ГАМК, що несуть субодиноцю альфа 3 і, на додаток до цього, діють як агоністи з низькою спорідненістю або часткові агоністи (із щонайменше 20-кратною різницею спорідненості), знову ж таки, з відданням особливої переваги частковим агоністам із низькою спорідненістю до субодиноцю альфа 1 та/або альфа 5. Сполуки 1-ар(алк)ілімідазолін-2-ону Формули I, що визначені вище, є сполуками, що демонструють необхідну селективність. Прикладом сполуки, що задовольняє критеріям селективності, як визначено вище, якій віддають особливу перевагу, є 1-(4-хлорфеніл)-4-піперидиноімідазолін-2-он (ELB139).

Несподівано встановили, що сполука ELB139 та інші речовини, що входять до обсягу цього винаходу, діють як високорівневі субтипово-селективні агоністи рецептора бензодіазепінів на рецептори, що несуть субодиноцю альфа 3. Природа впливу на ці рецептори є частково агоністичною, що вказує на те, що ці сполуки і, зокрема, сполука ELB139, діють як субтипово-селективні часткові агоністи рецепторів, що несуть субодиноцю альфа 3. Згадані сполуки і, зокрема, сполука ELB139, були також активними по відношенню до рецепторів, що несуть субодиноцю альфа 1 або альфа 5, однак із концентраціями, що більше ніж у 20 разів перевищували концентрацію для субодиноцю альфа 3. На додаток до цього, несподівано встановили, що згадані сполуки зовсім не проявляли активності відносно рецепторів, що містили субодиноцю альфа 2. Подібно іншим бензодіазепінам, сполука ELB139 також не проявляла активності відносно рецепторів, що несли субодиноцю альфа 4. Таким чином, сполука ELB139 діє як субтипово-селективна сполука, що активує рецептори, що містять субодиноцю альфа 3 і (з більш ніж у 20 разів слабкішою активністю) рецептори, що містять субодиноцю альфа 1 і альфа 5, із виключенням рецепторів, що містять субодиноцю альфа 2 і альфа 4. На усіх рецепторах, що демонструють чутливість до сполуки ELB139, ця сполука викликає менш сильне потенціювання ГАМК-індукованого імпульсу, порівняно з діазепамом, що свідчить про частково агоністичну властивість. У цьому відношенні, висновок про частково агоністичну активність робили у разі, якщо максимальна потенціація ГАМК-індукованого ефекту була нижчою при найбільшій випробуваній концентрації, порівняно з максимальним ефектом, індукованим діазепамом, як позитивною еталонною сполукою, при супрамаксимальній концентрації від 1мкМ до 10мкМ. Відносний частковий агонізм був у межах 50-70%. Унаслідок субтипової селективності згаданих сполук і, зокрема, з причини того, що сполу-

ка ELB139 є селективною щодо субодиноці альфа 3, згадані сполуки можуть застосовуватись для визначення ролі субодиноць альфа 3 відносно фізіології і фармакології. Встановили, що сполука ELB139 викликає підвищення рівнів серотоніну у головному мозку пацієнтів, однак механізм цього ефекту спочатку залишився нез'ясованим. Для додаткового з'ясування цього ефекту перевірили, чи не був він пов'язаним із дією переносників серотоніну, тобто з механізмом лікарських засобів, що обмежують функціонування цього переносника і, таким чином, обумовлюють підвищення рівнів серотоніну (селективні інгібітори повторного поглинання серотоніну, SSRI) або із зараз відомою селективною взаємодією з рецептором бензодіазепінів, що містить субодиноцю альфа 3. Сполуки за цим винаходом і, зокрема, сполука ELB139, не виявляли впливу на поглинання серотоніну синаптосомним препаратом. З іншого боку, вплив сполуки ELB139 на рівні позаклітинного серотоніну міг бути повністю блокованим і навіть зверненням шляхом введення специфічного блокатора рецептора бензодіазепінів, флумазенілу (flumazenil), який блокує взаємодію бензодіазепінів з усіма чутливими до бензодіазепінів рецепторами, у тому числі з рецептором, що містить субодиноцю альфа 3. Унаслідок субтипової селективності, ці дані чітко, і несподівано, вказують на те, що вплив сполуки ELB139 на серотонінергічну систему опосередковується рецептором бензодіазепінів, що містять субодиноцю альфа 3. Діазепам, за повідомленнями, не має впливу на рівні серотоніну у разі введення у подібних експериментах, що вказує на те, що цей вплив можуть виявляти лише субтипово-селективні сполуки. Таким чином, виходячи з цих даних, зараз дійшли висновку, що субодиноця альфа 3 є унікальною і новою мішенню для захворювань, що викликають ослаблене функціонування серотонінергічної системи, або для захворювань, у разі яких бажаним є посилене функціонування серотонінергічної системи, наприклад, при афективних розладах, у тому числі при депресивному і тривожному розладах.

За другим варіантом підходу, перевірили, чи психофармакологічні поведінкові ефекти сполуки ELB139, що були нетиповими для бензодіазепінів, могли бути змінені на протилежні введенням флумазенілу. Антидепресивний ефект може легко пов'язуватись із підвищенням рівнів серотоніну у головному мозку. Усі лікарські засоби, що підвищують рівень серотоніну, виявляють антидепресивні ефекти, у тому числі лікарські засоби, подібні флуоксетину (SSRI). Оскільки підвищення рівня серотоніну може запобігатись введенням флумазенілу, антипсихотичний ефект вибрали як найпридатніший для оцінки ролі субодиноці альфа 3 у психофармакологічному профілі сполуки ELB139. Відомо, що бензодіазепіни, позбавлені селективності щодо субодиноці альфа 3, не виявляють антипсихотичних ефектів. У разі введення флумазенілу у комбінації зі сполукою ELB139, антипсихотичний ефект сполуки ELB139 неочікувано антагонізувався. Ці дані вказують на те, що субодиноця альфа 3 є ідеальною мішенню не тільки для захворювань, що залучають серотонінергі-

чну систему, як описувалось вище, але також і для інших захворювань центральної нервової системи, наприклад, психозу. На додаток до цього, ці дані вказують на те, що сполука ELB139 та інші речовини, що є селективними щодо рецепторів, що містять субодиноцю альфа 3, є активними анксиолітиками, антидистонічними і антиконвульсивними засобами. Цей широкий спектр активності контрастує з субтиповою селективністю і обговорюваним зв'язком інших субодиноць, окрім субодиноці альфа 3, з різними захворюваннями. Наприклад, антиконвульсивна активність до цього часу співвідносилась, головним чином, із субодиноцю альфа 1, однак сполука ELB139 діє як дуже активний анксиолітик, незважаючи на низьку спорідненість до субодиноці альфа 1. Подібним чином, субодиноця альфа 2 розглядалась як головна для анксиолітичних ефектів із лише додатковим внеском субодиноці альфа 3 для тривожних розладів. Однак сполука ELB139 зовсім позбавлена активності відносно субодиноць альфа 2, оскільки є селективною щодо субодиноці альфа 3. Ці дані додатково вказують на те, що субодиноця альфа 3 і рецептор бензодіазепінів на субодиноцях альфа 3 є ідеальною мішенню для лікування цих захворювань, у тому числі тривоги і епілепсії.

Таким чином, підбиваючи підсумок, набір даних, тобто ефекти *in vivo* на моделях психозу, депресії, дистонії, епілепсії і тривоги, а також вплив на рівні серотоніну, що свідчить про антидепресивну активність, у поєднанні з субтипово-селективною активністю, відкриває можливість очікування того, що усі ліганди рецепторів бензодіазепінів, що є селективними щодо субодиноці альфа 3 рецепторів бензодіазепінів, можуть бути активними при вищезгаданих захворюваннях центральної нервової системи.

Таким чином, іншим об'єктом цього винаходу є фармацевтична композиція, що містить ліганд рецептора бензодіазепінів, селективний щодо субодиноці альфа 3 рецепторів бензодіазепінів. Такі речовини з високою селективністю щодо субодиноці альфа 3 можуть легко виявлятися за допомогою добре відомих і описаних систем скринінгу. Такі системи можуть включати аналізи зв'язування рецептора, як перший крок, однак із застосуванням аналізів зв'язування, які повинні ґрунтуватись на мембранних фракціях, що містять відповідні субодиноці рецептора ГАМК. Такі препарати можна одержати з клітинних ліній, що експресують і складають, після стабільної або тимчасової трансфекції, функціональний рецепторний комплекс ГАМК, що включає субодиноці альфа, що піддаються дослідженню, тобто альфа 1, альфа 2, альфа 3, альфа 4 або альфа 5, у комбінації з однією субодиноцю бета (за варіантом, якому віддають перевагу, субодиноцю бета 2 і однією субодиноцю гамма, за варіантом, якому віддають перевагу, субодиноцю гамма 2). Інше джерело субтипів рецепторів ГАМК можна одержати із систем експресії, що експресують рекомбінантні білки різних субодиноць. Такими системами експресії можуть бути бактерії, дріжджі або клітини еукаріоти. Завдяки застосуванню таких аналізів зв'язування, можуть легко ідентифікуватись сполу-

ки з високою спорідненістю до субодиниці альфа 3 і високою селективністю щодо інших рецепторів ГАМК, що містять субодиниці альфа 1, альфа 2, альфа 4 або альфа 5. Радіоактивним лігандом може бути 3(H)-флунітразепам або інші добре описані радіоактивні ліганди, позбавлені селективності щодо індивідуальних субодиниць ГАМК.

Оскільки ліганди рецептора бензодіазепінів можуть діяти як агоністи, нейтральні ліганди (антагоністи) і зворотні агоністи, для ідентифікації агоністів, а також часткових агоністів, необхідним є функціональний аналіз. Такими аналізами можуть бути модифіковані аналізи зв'язування із застосуванням зв'язування 3(H)-мусцимолу, як контролю, оскільки агоністи, антагоністи і зворотні агоністи на характеристики зв'язування мусцимолу впливають по-різному.

Основою різних функціональних аналізів, які можуть застосовуватись для ідентифікації притаманної активності лігандів рецепторів бензодіазепінів, є електрофізіологічні методи із застосуванням або ооцитів *Xenopus* як систем експресії, або трансфікованих клітинних ліній, наприклад, клітин СНО (яєчник китайського хом'ячка), трансфікованих відповідними субодиницями альфа, бета і гамма, як описано повсюди. І, знову ж таки, основою іншого функціонального аналізу можуть бути трансфіковані клітинні лінії, піддані дії ГАМК і сполуки, яку піддають випробуванню, однак із застосуванням мембранного потенціалу як контролю рецепторної взаємодії. Результатом такого постадійного варіанту відбору є сполука, що має високу селективність щодо субодиниці альфа 3, і яка може діяти як повний або частковий агоніст субодиниці альфа 3.

Така сполука-ліганд рецептора може також діяти як частковий агоніст із щонайменше у 20 разів нижчою спорідненістю до рецептора ГАМК, що містить субодиниці альфа 1 і 5, порівняно з рецептором ГАМК, що містить субодиницю альфа 3. За варіантом, якому віддають перевагу, така фармацевтична композиція містить 1-ар(алк)ілімідазолін-2-он Формули І, як визначено вище, що демонструє необхідну селективність. За варіантом, якому віддають перевагу, така фармацевтична композиція містить сполуку 1-(4-хлорфеніл)-4-піперидиноімідазолін-2-он (ELB139). Окрім того, можливо і подеколи рекомендовано, щоб фармацевтична композиція містила додаткові наповнювачі або допоміжні речовини і згадана композиція могла бути придатною для парентерального або для перорального введення. Подібно описаному вище, встановили, що ефективною дозою активної сполуки є доза 1-100мг на кг маси тіла хворого. Додаткові дози, що містяться у фармацевтичній композиції, яким віддають перевагу, становлять 2-70мг на кг маси тіла або 5-50мг на кг маси тіла для лікування шизофренії та інших психотичних захворювань, і 1-20мг на кг або 5-15мг на кг маси тіла для лікування дистонії.

Такі фармацевтичні композиції є придатними для лікування розладів центральної нервової системи і, за варіантом, якому віддають перевагу, для лікування психозу, депресії, дистонії, епілепсії і тривоги, як докладніше описано вище.

Такі сполуки або композиції, що включають сполуку ELB139, виявляють також селективні позитивні впливи на розлади центральної нервової системи, які зараз не можуть лікуватись доступними лігандами рецепторів бензодіазепінів, тобто депресію, психоз, дистонію і споріднені захворювання ЦНС, з особливою увагою до захворювань, які можуть лікуватись сполуками, що виявляють вплив на рівні серотоніну у головному мозку, у тому числі депресії. Такі сполуки також виявляють позитивний ефект у разі захворювань, що зараз можуть лікуватись лігандами рецепторів бензодіазепінів, однак із кращим профілем побічних дій, зі зниженням амнезійного, седативного, снодійного, індукуючого звикання, міорелаксантажного і ЦНС-депресійного ефекту лігандів рецепторів бензодіазепінів і послабленням розвитку толерантності. До таких захворювань належать тривожні розлади, епілепсія, розлади сну та інші захворювання, що реагують на лікування бензодіазепінами.

Винахід додатково пояснюється наведеними нижче прикладами і фігурами.

На фігурах зображено:

Фіг.1: активність, загальна подолана відстань, стереотипне обнюхування, інші стереотипії і атаксія, стимульовані 0,2мг/кг сполуки МК-801, яка була введена внутрішньоочередивно пацієнтам за 10хв. до проведення тесту.

Галоперидол (внутрішньоочередивно) і сполука E131-00139 (перорально) були введені за 1год. до проведення тесту. *статистична значущість порівняно з контролем, $p < 0,05$, **статистична значущість порівняно з контролем, $p < 0,01$, ***статистична значущість порівняно з контролем, $p < 0,001$, # суттєво різні одна до одної, $p < 0,05$.

Фіг.2: антидистонічна активність сполуки E131-00139.

При меншій дозі, тобто при 5мг/кг (внутрішньоочередивно), все ще спостерігається значна антидистонічна активність.

Фіг.3: вплив сполуки E131-00139 на вивільнення 5-HT у смугастому тілі пацієнтів.

Сполука E131-00139 у дозі 30мг/кг була введена внутрішньоочередивно. Дані наведені як відсоток середнього вихідного рівня 5-HT (середня квадратична помилка середнього); *статистична значущість порівняно з тилозою, $p < 0,05$.

Фіг.4: вплив сполуки E131-00139 на виділення допаміну у смугастому тілі пацієнтів.

Сполука E131-00139 у дозі 30мг/кг була введена внутрішньоочередивно. Дані наведені як відсоток середнього вихідного рівня допаміну (середня квадратична помилка середнього).

Фіг.5: цілоклітинна реєстрація клітин HEK293, що експресують рекомбінантні рецептори ГАМК α 1 β 2 γ 2 ($i=1-5$) пацієнтів. Імпульси були нормалізовані до застосованих концентрацій ГАМК за відсутності усіх інших лікарських засобів. Підвищені концентрації діазепаму (\blacktriangle), діазепаму+10мкМ сполуки Ro15-1788 (Δ), сполуки E131-139 (\blacksquare) або сполуки E131-139+10мкМ сполуки Ro15-1788 (\square) застосовували одночасно з ГАМК з концентраціями приблизно EC₂₀. Столпчики помилок відображають середню квадратичну помилку середнього (\pm SEM) для 4 клітин кожний.

Фіг.6: вплив сполуки ELB139 (=сполука E131-00139, 10-30мг/кг) на час, проведений у непорушності, тривалість плавання і період часу, коли тварини намагались вилізти під час випробування з примусовим плаванням пацюків, порівняно з контрольними тваринами, що одержали носій (* $p < 0,05$, однофакторний дисперсійний аналіз з подальшою обробкою даних за методом Холм-Сідак). Дані представлені як середня величина \pm середня квадратична помилка середнього ($n=10$).

Фіг.7: вплив флуоксетину (10-30мг/кг) на час, проведений у непорушності, тривалість плавання і період часу, коли тварини намагались вилізти під час випробування з примусовим плаванням пацюків, порівняно з контрольними тваринами, що одержали носій (* $p < 0,05$, однофакторний дисперсійний аналіз з подальшою обробкою даних за методом Холм-Сідак). Дані представлені як середня величина \pm середня квадратична помилка середнього ($n=10$).

Фіг.8: вплив галоперидолу на МК-801-індуковану, пов'язану з психозом поведінку пацюків-самиць.

Показані два окремі випробування. Галоперидол (Н) (0,5мг/кг, внутрішньоочеревинно) вводили за 60хв. до випробування, у разі самотійного застосування, і за 30хв. до випробування, у разі введення на додаток до флумазенілу (F). Флумазеніл (5мг/кг, внутрішньоочеревинно) вводили за 20хв. до випробування. Сполуку МК-801 (0,1мг/кг, внутрішньоочеревинно) вводили за 10хв. до випробування. Дані представлені як середня величина \pm середня квадратична помилка середнього. Статистична значущість порівняно з контролем (С): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Фіг.9: вплив сполуки ELB139 на МК-801-індуковану, пов'язану з психозом поведінку і звертання дії флумазенілом у пацюків-самиць.

Сполуку ELB139 (30мг/кг, перорально) вводили за 1год. до випробування. Флумазеніл (5мг/кг, внутрішньоочеревинно) вводили за 20хв. до випробування. Сполуку МК-801 (0,1мг/кг, внутрішньоочеревинно) вводили за 10хв. до випробування. Вплив на МК-801-індуковане стереотипне обнюхування, інші стереотипи і атакію представлено як середню величину \pm середня квадратична помилка середнього. Статистична значущість порівняно з контролем: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Значущість порівняно з групою ELB139: # $p < 0,05$.

Фіг.10а: вплив сполуки ELB139 на МК-801-індуковану, пов'язану з психозом поведінку і звертання дії флумазенілом у пацюків-самиць.

Сполуку ELB139 (30мг/кг, перорально) вводили за 1год. до випробування. Флумазеніл (5мг/кг, внутрішньоочеревинно) вводили за 20хв. до випробування. МК-801 (0,1мг/кг, внутрішньоочеревинно) вводили за 10хв. до випробування. Вплив на МК-801-підвищену активність і подолану відстань представлено як середню величину \pm середня квадратична помилка середнього. Статистична значущість порівняно з контролем: * $p < 0,05$; значущість порівняно з групою ELB139: # $p < 0,05$.

Фіг.10b: вплив сполуки ELB139 на МК-801-індуковану, пов'язану з психозом поведінку і звертання дії флумазенілом у пацюків-самиць.

Сполуку ELB139 (30мг/кг, перорально) вводили за 1год. до випробування. Флумазеніл (5мг/кг, внутрішньоочеревинно) вводили за 20хв. до випробування. Сполуку МК-801 (0,1мг/кг, внутрішньоочеревинно) вводили за 10хв. до випробування. Вплив на МК-801-підвищену активність і подолану відстань представлено з 5хв. інтервалами як середню величину \pm середня квадратична помилка середнього. Статистична значущість порівняно з контролем: * $p < 0,05$; значущість порівняно з групою ELB139: # $p < 0,05$.

Приклади

1. Лікування психотичних розладів

1.1. Тварини

Для проведення експерименту використовували пацюків-самиць лінії Wistar (CrI:(WI) BR, Charles River, Sulzfeld, Германія) масою від 150г до 180г. Тварини групами по 5 голів були розміщені у клітках за стандартних умов з 12год. циклом чергування світла і темряви (світло вмикали о 06.00) з доступом до їжі (гранульований корм Pellets, ssniff M/R 15, Spezialdiat GmbH, Soest/Westfalen) і води ad libitum.

1.2. Хімікати

Сполука E131-00139 (1-(4-хлорфеніл)-4-піперидиноімідазолін-2-он, молекулярна маса 277,75) була виготовлена фірмою Elbion AG. Галоперидол (4-(4-[4-хлорфеніл]-4-гідрокси-1-піперидиніл)-1-(4-фторфеніл)-1-нутанон, молекулярна маса 375,9) одержали від фірми Ratiopharm GmbH (Ulm, Германія), сполуку МК-801 (дізоцилпін (dizocilpine), молекулярна маса 337,37) одержали від фірми Tocris (розповсюджується фірмою Biotrend Chemikalien GmbH (Köln, Германія)). Усі інші застосовані хімікати одержали від фірми Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Германія) або від фірми Merck (Германія).

1.3. Схема введення і дози лікарських препаратів

Застосований об'єм: 0,5мл/100г

Речовина	Кількість тварин [n]	Доза [мг/кг]	Попередня обробка [хв.]	Кількість застосувань [n]	Шлях введення
МК-801	17	0,2	10	1	Внутрішньо-очеревинний
E131-00139	6	30, 60	60	1	Пероральний
Галоперидол	10	0,5	60	1	Внутрішньо-очеревинний

1.4. Одержання сполук

Сполуку E131-00139 безпосередньо перед проведенням експерименту суспендували у 0,5% гідроксіетилцелюлози, завдяки чому для кожної речовини і дози одержали об'єм введення

0,5мл/100г. Галоперидол (розчин для ін'єкцій) розбавляли фізіологічним розчином, завдяки чому одержали об'єм введення 0,5мл/100г. Суспензії знаходились на магнітній мішалці перед і під час введення доз.

1.5. Експериментальна методика

Поведінка, індукована сполукою МК-801 (антагоніст NMDA), є загальноприйнятою як модель психозу на пацюках. Сполука МК-801, у разі внутрішньоочеревинного введення, індукує у пацюків стереотипії, гіперактивність і атаксію.

Рухова активність пацюків реєструється апаратом MotiTest (TSE, Bad Homburg, Германія). Експериментальна ділянка являє собою квадратний майданчик (45 смх45 см) із захисними стінками з органічного скла (висотою 20см), де пацюки могли вільно рухатись. Рухи у горизонтальній площині реєструвались 32 інфрачервоними фотоелементами, розміщеними вздовж нижньої частини кожної стінки майданчика. Рухи у вертикальній

площині (вертикальні стойки) реєструвались горизонтальним рядом із 32 інфрачервоних фотоелементів на висоті 12 см від підлоги. Комп'ютерна програма "ActiMot" (TSE, Bad Homburg, Германія) вимірювала наведені нижче параметри:

активний час [s (с)] і загальна подолана відстань [m (м)].

Стереотипії, поділені на стереотипне обнюхування і інші стереотипії, і атаксія оцінювались експериментатором у балах кожні п'ять хвилин впродовж однієї години (12 інтервалів) за методом, описаним Андіне (Andine) та іншими (1999). Бальні оцінки 12 інтервалів для кожного параметра додаються.

Оцінка у балах	Стереотипне обнюхування	Інші стереотипії	Атаксія
0	Відсутність стереотипного обнюхування	Відсутність інших стереотипій	Нормальне управління тілом
1	Періодичне обнюхування (вільний інтервал>5с)	Періодичні стереотипії (вільний інтервал>5с)	Схильність до падіння під час руху
2	Постійне обнюхування	Постійні стереотипії	Падіння під час руху
3	-	-	Майже повна нездатність рухатись

У день проведення експерименту пацюків-самиць переносять до лабораторії і у відповідний час до початку тестування вводять експериментальну сполуку, контрольну сполуку або носій. Сполуку МК-801 вводять (0,2мг/кг, внутрішньоочеревинно) за 10хв. до проведення тесту.

На початку тесту пацюків вмішують у центрі квадратного майданчика апарата MotiTest. Поведінку пацюків реєструють впродовж однієї години. Після кожної серії експериментів тварин видаляють, клітки ретельно чистять і висушують.

1.6. Статистика

Результати піддавали однофакторному дисперсійному аналізу (ANOVA). Для індивідуального порівняння застосовували критерій Такі. $P < 0,05$ вважали статистично значущим.

1.7. Результати

Результати тесту представлені на Фіг.1. Галоперидол значно послабив усі симптоми, індуковані сполукою МК-801 [$p < 0,001$], як описано Андіне (Andine) та іншими (1999). Сполука E131-00139 у дозі 30мг/кг (перорально) значною мірою зворотила стереотипне обнюхування, інші стереотипії і атаксію, індуковану сполукою МК-801, і явно зменшувала загальну подолану відстань, підвищену сполукою МК-801. Згадана сполука у вказаній дозі не послаблювала МК-801-стимульовану активність.

Речовина	Кількість тварин [n]	Доза [мг/кг]	Час спостереження після введення [хв.]	Кількість застосувань [n]	Шлях введення
E131-00139					Внутрішньо-очеревинний
E131-00139					Внутрішньо-очеревинний

2.4. Одержання сполук

Сполуку E131-00139 безпосередньо перед проведенням експерименту суспендували у 0,5% гідроксіетилцелюлози, завдяки чому для кожної речовини і дози одержали об'єм введення 0,2мл/20г. Суспензії знаходились на магнітній мі-

У дозі 60мг/кг (перорально), сполука E131-00139 значно зменшувала усі параметри, індуковані сполукою МК-801.

Стереотипне обнюхування ослаблювалось дозозалежним чином [$p < 0,05$].

2. Лікування дистонії

Експерименти проводили на мутантних (dt^{SZ}) золотистих хом'ячках (самцях і самицях), яких одержали шляхом селекційного розведення, як докладно описувалось раніше (Фредоу (Fredow), Лошер (Loscher), 1991). Тварини групами від трьох до п'яти голів були розміщені у клітках за стандартних умов із 12 годинним циклом чергування світла і темряви (світло вмикали о 06.00) із доступом до їжі (стандартна дієта Altromin 1320, Altromin, Lage, Германія) і води ad libitum.

2.2. Хімікати

Сполука E131-00139 (1-(4-хлорфеніл)-4-піперидиноімідазолін-2-он, молекулярна маса 277,75) була виготовлена фірмою Elbion AG. Усі інші застосовані хімікати одержали від фірми Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Германія) або від фірми Merck (Германія).

2.3. Схема введення і дози лікарських препаратів

Застосований об'єм: 0,2мл/20г

шалці перед і під час введення доз. Гідроксіетилцелюлозу розчиняли у дистильованій воді.

2.5. Експериментальна методика

Випробування лікарських засобів здійснювали при максимальній чутливості хом'ячків до індукування нападів дистонії, тобто у віці від 30 днів до

40 днів. Напади дистонії індукували потрійним методом стимулювання. Хом'яків видаляли з клітин, вмішували на терези (для визначення маси тіла), робили внутрішньоочеревинну ін'єкцію фізіологічного розчину (контроль) або лікарського препарату і негайно після цього кожну тварину окремо вмішували до нової і порожньої пластикової клітки. На-

пади дистонії починались через кілька хвилин після вміщення хом'яків до нової пластикової клітки. Тварин спостерігали у клітці впродовж 3 год.; тяжкість дистонічних рухів оцінювали у балах впродовж 0-1 год., 1-2 год. і 2-3 год. таким чином (оцінці завжди піддавався максимальний ступінь, який було досягнуто у межах періоду спостереження):

Стадія 1	Вуха притиснуті до голови, розпластування під час ходіння
Стадія 2	Судоми м'язів морди, вертикальна стійка з перехрещеними передніми лапами, непевна хода із запізненою постановкою задніх лап
Стадія 3	Тугорухливість задніх лап, завдяки чому видається, що тварина рухається на кінчиках пальців ходою з порушеною координацією рухів
Стадія 4	Втрата рівноваги
Стадія 5	Задні лапи витягнуті у напрямку хвоста, тварини намагаються підтягуватись, працюючи передніми лапами
Стадія 6	Тварини лежать нерухомо, здригаються у згорбленому положенні, передні і задні лапи тонічно витягнуті вперед, хвіст випрямлений, почергове піднімання лап з одного боку, голова хитається, опістотонус

Кінцева стадія тривала впродовж двох-п'яти годин, після чого відбувалось швидке одужання. Усі мутантні хом'ячки не проходили через усю описану послідовність; максимальна стадія у індивідуальному порядку досягалась, як правило, через 45-170 хв.

2.6. Статистика

Результати спочатку аналізували за критерієм Фрідмана, потім за критерієм Уїлкоксона. $P < 0,05$ вважали статистично значущим.

2.7. Результати

Першу групу тварин ($n=8$) перевіряли на появу і тяжкість дистонічних нападів у віці 32-33 дні після введення носія (внутрішньоочеревинно), а також після здійснення потрійної процедури стимулювання, як описано вище. Через два або три дні ті самі тварини одержували сполуку E131-00139 (внутрішньоочеревинно), знову піддавались спостереженню впродовж 3 год. і знову через 2-3 дні піддавались повторній перевірці після введення носія, який застосовували як контроль після введення дози. Результати цих тестів наведені на Фіг.2. На цьому графіку представлені три групи з трьох стовпчиків кожна. Перша група представляє першу годину спостереження, розпочинаючи з введення лікарського засобу, друга група стовпчиків представляє другу годину спостереження, а третя група представляє третю годину.

Кожна група складається із трьох стовпчиків. Перший (світлий) стовпчик представляє контрольну реакцію тварин, що реєструється за 2-3 дні до випробування лікарського препарату, чорний стовпчик представляє результати, одержані після введення лікарського препарату, і третій (сірий) стовпчик представляє результати, одержані при введенні контролю, яке здійснювали через 2-3 дні після введення лікарського препарату. Випробування перед і після введення дози здійснювали для виключення ймовірності того, що ослаблення тяжкості стадій обумовлювалось лише зниженням чутливості відносно індукування дистонічних нападів у залежності від віку.

У цьому експерименті було показано, що сполука E131-00139 проявляє сильний антидистонічний ефект. Сполука у перевіреній дозі, тобто 10 мг/кг внутрішньоочеревинно, добре переносилась без седативного ефекту. Впродовж усього періоду спостереження тяжкість дистонічного нападу значно зменшувалась, що свідчило про довготривалість дії. Залишкові симптоми (тобто симптоми на середній стадії 2.3-2.4) спостерігались на стадіях, які досягались впродовж хвилин після початку експерименту, тобто впродовж періоду часу, коли сполука E131-00139 у плазмі була ще відсутньою або реєструвались лише її мінімальні рівні.

3. Анксіолітична і антидепресивна активність.

Для додаткового визначення характеристик сполуки E131-00139, згадану сполуку піддавали дослідженню за допомогою мікродіалізу. Позаклітинну концентрацію двох нейромедіаторів, серотоніну (5-HT) і допаміну, та їх метаболітів визначали у смугастому тілі.

3.1. Тварини

Для проведення експерименту використовували пацюків-самців лінії Wistar (CrI:(WI) BR, Charles River, Sulzfeld, Германія) масою від 200 г до 260 г. Тварини групами по 5 голів були розміщені у клітках за стандартних умов із 12 годинним циклом чергування світла і темряви (світло вмикали о 06.00) з доступом до їжі (гранульований корм Pellets, ssniff M/R 15, Spezialdiät GmbH, Soest/Westfalen) і води ad libitum.

3.2. Хімікати

Сполука E131-00139 (1-(4-хлорфеніл)-4-піперидиноімідазолін-2-он, молекулярна маса 277,75) була виготовлена фірмою Elbion AG. Усі інші застосовані хімікати одержали від фірми Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Германія) або від фірми Merck (Германія).

3.3. Схема введення і дози лікарських препаратів

Шлях введення: внутрішньоочеревинно.

Застосований об'єм: 0,5 мл/100 г.

Речовина	Доза [мг/кг]	Час попередньої обробки [хв.]	Кількість застосувань [n]
E131-00139	30	0	0

3.4. Одержання сполук, суспендованих у 0,5% розчині гідроксіетилцелюлози, що містить 10% поліетиленгліколю 300 (PEG 300)

Сполуку E131-00139 безпосередньо перед проведенням експерименту суспендували у 0,5% гідроксіетилцелюлози, завдяки чому для кожної дози одержали об'єм введення 0,5мл/100г. Суспензії знаходились на магнітній мішалці перед і під час введення доз. Гідроксіетилцелюлозу розчиняли у дистильованій воді.

3.5. Експериментальна методика Хірургічна процедура

За день до експерименту пацюків-самців наркотизували хлоралгідратом (3,6%, 1мл/100г, внутрішньоочеревинно) і розмістили у стереотаксичній рамці для імплантування мікродіалізної напрямної канюлі (CMA/12, Carnegie Medicine, Швеція). Волохисту частину шкіри голови надрізували посередині у передньо-задньому напрямку між ламбдою і брегмою, і у черепі висвердлювали отвір невеликого діаметра. Стереотаксичні координати: AP=+1,0мм, L=-3,0мм від брегми і 1,5мм від поверхні черепа до смугастого тіла за атласом Паксинос (Paxinos) і Уотсон (Watson) (1986) (1). Для прикріплення напрямної канюлі до черепа застосовували стоматологічний цемент (Sinfony (2)) і анкерні гвинти. Під час проведення хірургічного втручання, ректальну температуру підтримували на рівні 37°C за допомогою ковдри для нагрівання.

Мікродіаліз

За день до проведення експерименту мікродіалізний зонд (CMA/12, довжина мембрани 4мм, Carnegie Medicine, Швеція) вводили до смугастого тіла через напрямну канюлю. У день проведення експерименту зонд піддавали перфузії розчином Рінгера-Локка (148мм NaCl, 4мм KCl, 2,4мм CaCl₂, pH6,0). Швидкість потоку (1мл/хв.) уможливила збирання до мікропробірок 20мл зразків кожні 20хв. Мікропробірки до проведення аналізу зберігали у колекторі фракцій (CMA/170) при температурі 8°C. Завдяки вертлюжному з'єднанню,

пристрій для перфузії дозволяв тварині вільно рухатись у напівкруглому резервуарі. Після 1год. адаптаційного періоду збирали 3 послідовні 20хв. фракції для встановлення стабільного вихідного рівня вивільнення нейромедіатору.

Після цього вводили сполуку E131-00139 (30мг/кг) або еквівалентний об'єм 0,5% тилози/PEG300 (9:1), відповідно. Потім збирання зразків продовжували впродовж щонайменше 220хв.

Аналіз діалізатів

Діалізати піддавали безпосередньому аналізу шляхом високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою і електрохімічним детектуванням (HPLC-EC). Зразки розділяли на колонці ZORBAX SB-Aq (2,1мм (внутрішній діаметр)×100мм) (Agilent Technologies). До 20хв. фракції додавали 1мл 1% перхлорної кислоти і 10мл цієї суміші вводили до системи HPLC.

Рухома фаза містила:

КН ₂ РО ₄	50мм
Натрієва сіль октан-1-сульфокислоти (NOS)	2,2мм
EDTA (етилендіамінтетраоцтова кислота)	0,086мм
2МН ₃ РО ₄	5мл
Метанол (MeOH)	83мл
Ацетонітрил	10мл
	pH3,5

Серотонін пропускали зі швидкістю потоку 0,23мл/хв. при температурі 38°C; термостат для зберігання зразків мав температуру 8°C.

У нічний час швидкість потоку знижували до 0,1мл/хв. Катехоламіни окиснювали при 500мВ (мікродіалізна комірка модель 5014В, ESA). Допак вимірювали при 200нА, допамін при 2нА, НІАА (5-окси-3-індолоцтова кислота) при 100нА, НВА (гомованілінова кислота) при 2нА і серотонін при 500пА.

Для калібрування системи регулярно пропускали зовнішні стандарти у 5 концентраціях кожний:

DOPAC (3,4-дигідроксифенілоцтова кислота)	1000, 500, 250, 125, 62,5нМ
DOPAMINE (3-гідрокситираміну гідрохлорид)	8, 4, 2, 1, 0,5нМ
HIAA (5-окси-3-індолоцтова кислота)	200, 100, 50, 25, 12,5нМ
HVA (гомованілінова кислота)	800, 400, 200, 100, 50нМ
SEROTONIN (5-окситриптамінкреатинінсульфат)	0,15, 0,075, 0,0375, 0,01875, 0,009375нМ

Перед імплантуванням та після видалення мікродіалізної зонда, регенерацію здійснювали за допомогою розчину, що містив 2000нМ DOPAC, 40нМ допаміну, 1000нМ НІАА, 2000нМ НВА і 0,8нМ серотоніну. Швидкість регенерації зондів знаходилась у межах 5-20%.

Гістологія

Після завершення експерименту головний мозок пацюків видаляли і піддавали вторинній фіксації у формаліні (10%) впродовж приблизно 10 днів. Головний мозок розрізали за допомогою віброножа для одержання зрізів (TSE) і забарвлювали толуїдиновим синім для перевірки відповідного положення зондів.

Статистика

Вихідний рівень вивільнення 5-НТ показав міжіндивідуальні різниці. З цієї причини дані по кожній тварині виражали у відсотках. Дані діалізатів перед введенням речовин усереднювали і середнє значення приймали за 100%; усі індивідуальні значення обчислювали відповідним чином.

Результати піддавали двофакторному дисперсійному аналізу (ANOVA), де двома факторами виступали час і лікарський засіб. Для індивідуального порівняння застосовували критерій Такі. Р<0,05 вважали статистично значущим.

3.6. Результати

Сполука E131-00139 (30мг/кг, внутрішньоочеревинно) значно і несподівано підвищила концентрацію 5-НТ у смугастому тілі пацюків на 1год. 40хв. (Фіг.3) без впливу на концентрацію НІАА, метабо-

літ 5-HT (дані не показані). Вона також не вплинула на одночасно визначену концентрацію допаміну у смугастому тілі пацієнтів (Фіг.4). Зміни рівнів 5-HT свідчать про анкісолітичний і антидепресивний ефект.

Механізм цього підвищення незрозумілий. Його не можна пояснити бензодіазепіноподібною активністю згаданої сполуки, оскільки бензодіазепіни, наприклад, діазепам, не підвищують, а скоріше знижують вивільнення 5-HT у головному мозку (Pi (Pei) та інші, 1989) і, тим самим, протидіють впливу селективних інгібіторів повторного поглинання серотоніну. На додаток до цього, підвищення рівня 5-HT у смугастому тілі не є незамінним і типовим механізмом антиепілептичних лікарських засобів, оскільки вплив антиепілептичних лікарських засобів на вивільнення 5-HT у головному мозку змінюється у залежності від антиконвульсивного лікарського препарату. Карбамазепін (carbamazepine) також викликає підвищення вихідного рівня вивільнення 5-HT, можливо, завдяки впливу на Ca^{2+} канали N-типу (Кавата (Kawata) та інші, 2001). Валпроат (valproate) також підвищує позаклітинні рівні 5-HT (Мураками (Murakami) та інші, 2001), у той час як фенітоїн (phenytoin) і габапентин (gabapentin) знижують їх (Окада (Okada) та інші, 1997; Тейлор (Taylor) та інші, 1998).

Вплив сполуки E131-00139 на позаклітинну концентрацію 5-HT може порівнюватись з впливом флуоксетину і інших селективних інгібіторів повторного поглинання серотоніну (SSRI) (Лі (Li) та інші, 1996). Таким чином, сполука E131-00139 відкриває нові можливості для лікування розладів центральної нервової системи, оскільки сполуки цього класу можуть об'єднувати довготривалу, однак пізню, появу ознак активності лікарських засобів, що підвищують позаклітинну концентрацію 5-HT у головному мозку, з прямою і швидкою появою ознак анкісолітичної активності бензодіазепінів, що є добре відомою властивістю сполук класу 1-ар(алк)ілімідазолін-2-онів. Завдяки об'єднанню вигідного профілю агоніста бензодіазепінів і профілю SSRI без жодного ризику зменшення бензодіазепінопосередкованого впливу на рівень серотоніну, сполука E131-00139 демонструє виключний і поліпшений потенціал для лікування хронічних тривожних розладів, панічного розладу, агорафобії, специфічної фобії, соціальної фобії та генералізованого тривожного розладу, і депресивних розладів, наприклад, тяжкого депресивного розладу і епізодів, епізодів маніакального, змінного та гіпоманіакального настрою, депресивних епізодів з атиповими, кататонічними або меланхолічними проявами, депресивних епізодів із передменструальним дисфорійним розладом, який виникає у післяпологовий період, легкого депресивного розладу, посттравматичного і гострого стресового розладу.

Приклад 4

Субтипово-селективний і частково агоністичний ефект сполуки E131-00139 як приклад субтипово-селективної, частково агоністичної, сполуки, що віддає перевагу субодиниці альфа 3.

Іонні канали, що відкриваються γ -аміномасляною кислотою (рецептори ГАМК_A), про-

ходження сигналів через які керується лігандами, являють собою пентамери, складені з двох-трьох субодиниць із набору з шести субодиниць α , трьох β , трьох γ , δ , ϵ , π і θ (дивись Хіверс (Hevers) та інші, 1998). Найімовірніше, що саме структурна гетерогенність рецепторів ГАМК_A створює основу для їх функціональної розмаїтості. Більшість бензодіазепінів (BZ), що розпізнають рецептор ГАМК_A, модулюють перенесення Cl^- через ці рецепторні канали, впливаючи таким чином на синаптичну передачу у ЦНС. Наприклад, седативно-снодійний BZ діазепам, що застосовується у цьому дослідженні як еталонна сполука, накладає ряд впливів на функціонування ЦНС, наслідком чого є цілий ряд клінічних дій у діапазоні від седативного ефекту при низьких дозах до індукції анестезії при значно вищих дозах. Таким чином, великі зусилля докладаються до поліпшення ГАМКергічної субтипової специфічності лікарських засобів типу бензодіазепінів для послаблення їх дій на ті нейронні системи, що не є залученими до терапевтичних ефектів.

Субодиничний склад рецепторів ГАМК_A визначає як спорідненість, так і ефективність ендогенного ліганду, а також лікарських засобів типу бензодіазепінів. Зміни серед субодиниць α глибоко впливають на спорідненість і ефективність бензодіазепінових лігандів різних класів, у той час як інші класи залишаються нерозрізненими (Притчетт (Pritchett) та інші, 1989; Уїзден (Widzen) та інші, 1991). Раніше було показано, наприклад, що діазепам, подібно більшості, але не усім, іншим 1,4-бензодіазепінам, недиференційовано зв'язується із субтипами рецепторів загальної форми $\alpha\beta\gamma_2$ ($i=1-3$, $j=1-3$) (Людценс (Luddens), 1995; Бенавідес (Benavides), 1992, Притчетт (Pritchett), 1990).

Цей експеримент провели для докладного вивчення активності та ефективності гіпотетичного ліганду рецептора бензодіазепінів, сполуки ELB139, у присутності та за відсутності антагоніста бензодіазепінів, флумазенілу (flumazenil) (сполука Ro15-1788), відносно ряду субтипів рецептора ГАМК_A, експресованих у гетерологічній системі клітин нирок людського зародка (HEK293). Вибрані субтипи рецепторів $\alpha\beta\gamma_2$ ($i=1-5$) представляють, ймовірно, більшість нативних ГАМК_A/BZ-рецепторів. Ефективність, активність і α субодиничну специфічність нової сполуки порівнювали з відповідними параметрами діазепаму.

4.1. Експериментальний розділ Матеріали

Усі сполуки, за винятком сполуки ELB139 (сполука E131-00139), походили з комерційних джерел і мали аналітичну чистоту.

4.2. Культивування і трансфекція клітин

Для електрофізіологічної реєстрації, клітини HEK293 пасажували і пересівали на 12мм покривні стекла, що знаходились у 9,6 см пластикових чашках, заповнених 10мл мінімального підтримувального живильного середовища (MEM, Gibco), доповненого 158мг/л бікарбонату натрію, 2мМ глутаміну (Gibco), 100Од/мл пеніциліну-стрептоміцину (Gibco) і 10% сироватки зародка великої рогатої худоби (Gibco). Культури підтримували при температурі 37°C у зволоженій атмосфері 95% O_2 /5% CO_2 впродовж 2-3 днів.

Трансфекцію рекомбінантними паючими рецепторами ГАМКд здійснювали, як докладно описано (Корпі (Korpi), Людденс (Luddens), 1993, Людденс (Luddens), Корпі (Korpi), 1995b). Стисло, клітини HEK293 трансфікували потрійними комбінаціями із застосуванням методу осадження фосфатом із кДНК паючих рецепторів ГАМК_A у еукаріотних векторах експресії (Притчетт (Pritchett), 1990) для субодиниць α , β і γ . Для оптимальної експресії рецептора, кінцеві концентрації (мкг векторної ДНК на 9,6см планшет для культури тканин) дорівнювали: α 1, 2; α 2, 4,8; α 3, 1,2; α 4, 10; α 5, 0,8; β 2, 0,4; і γ 2S, 0,3. Варіант γ 2S у подальшому тексті скорочено позначається як γ 2. Для ідентифікації трансфікованих клітин усі комбінації субодиниць одночасно трансфікували 1мкг/планшет рNI-EGFP (епідермальний фактор росту).

4.3. Електрофізіологія

Через два дні після трансфекції окремі покриті стеклом, на яких знаходились клітини HEK293, внесли до реєстраційної камери, змонтованої на рухомому столі флуоресцентного мікроскопа (Olympus IX70) і піддали перфузії фізіологічним розчином певного складу, що містив (у мМ): 130 NaCl, 5,4 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgSO₄, 10 глюкози, 5 цукрози і 10 ГЕПЕС (вільна кислота). рН, за допомогою приблизно 35мМ NaOH, довели до рівня 7,35. Трансфіковані клітини ідентифікували за їх флуоресценцією зеленого кольору, яка викликала експресією вектора рNI-EGFP, і мембранні імпульси цих клітин, опосередковані лігандами, досліджувались у цільноклітинній конфігурації методу "відкриття-закриття" (Хеміл (Hamil) та інші, 1981). Петч-піпетки витягували (за багатадіним способом) із твердого боросилкатного капілярного скла (0,5мм (внутрішній діаметр), 1,5мм (зовнішній діаметр), Vitrex, Science Products GmbH, Hofheim, Германия) за допомогою пристрою для горизонтального витягування (Sutter Instruments, штат Каліфорнія, модель Р-97). Вихідний опір піпеток, заповнених розчином, що містив (у мМ): 90 KCl, 50 КОН, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 етилендіамінтетраоцтової кислоти, 3,1 аденозин-5'-трифосфату (двонатрієва сіль), 0,4 гуанозин-5'-трифосфату (тринатрієва сіль) і 10 ГЕПЕС (вільна кислота) (рН7,35) становив 2-4МОм.

Потенціал контакту між піпеткою і зовнішнім розчином був меншим за 2,3мВ, і його відкидали. Опір герметики >1ГОм поточним шляхом одержували завдяки прикладенню до піпетки обережного всмоктування. Розрив мембрани відслідковували за електричними показниками як підвищення ємності. Ємність піпетки, ємність мембрани і опір послідовного з'єднання компенсували електронними засобами для забезпечення мінімально ємних перехідних процесів. Регулярно вдавались до компенсації опору послідовного з'єднання, величина якої перевищувала >60%.

У системі поетапної прискореної перфузії (SF-77B, Perfusion Fast Step, Warner Instruments, Inc., Midwest, США) були застосовані експериментальні розчини, що містили специфічну для субтипу рецепторів EC₂₀ ГАМК, EC₂₀ ГАМК плюс зростаючі концентрації діазепаму (у мМ): 0,01, 0,1, 1, 10 і EC₂₀ ГАМК плюс зростаючі концентрації сполуки

ELB139 (у мМ): 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30. У разі діазепаму і сполуки ELB139, перевірки піддали увесь експериментальний набір усіх концентрацій з додатковими 10мМ сполуки Ro15-1788. Перед перевіркою експериментальних лікарських засобів, в усіх реєстрованих клітинах перевіряли (за допомогою 1мМ золпідему (zolpidem) плюс EC₂₀ ГАМК) присутність субодиниці γ 2.

Реакцію клітин реєстрували за допомогою петч-підсилювача (EPC-8, HEKA-Electronic, Lambrecht, Германия), підключеного до стандартного персонального комп'ютера, із застосуванням пакету програм pClamp 8.1 (Axon Instruments, Foster City, штат Каліфорнія). Стандартний вихідний потенціал для клітин становив -40мВ. Імпульси цільних клітин пропускали через восьмиполосний фільтр нижніх частот (Bessel) при 5кГц або 3кГц перед перетворенням на цифрову форму за допомогою інтерфейсу Digidata 1322A (Axon Instruments, Foster City, штат Каліфорнія) і реєстрували за допомогою комп'ютера при частоті виборки щонайменше 1кГц.

4.4. Результати і обговорення

Ефективність, активність і специфічність нової сполуки ELB139 щодо субодиниці α рецептора ГАМК_A перевіряли у рамках цільноклітинної конфігурації методу "відкриття-закриття" шляхом піддання зелених флуоресціюючих клітин дії зростаючої концентрації лікарського засобу у поєднанні з приблизно EC₂₀ ГАМК. Специфічність нової сполуки щодо сайту зв'язування бензодіазепінів перевіряли на тих самих клітинах за ідентичних експериментальних умов із додатковим застосуванням 10мМ сполуки Ro15-1788.

У α 1-, α 3- і α 5-вмісних рецепторів, коекспресованих із субодиницями β 2 і γ 2, сполука ELB139 підсилювала ГАМК-індуковані імпульси, однак згадана сполука була менш активною і менш ефективною аніж діазепам (Таблиця 1). 10мМ сполуки Ro15-1788 повністю ліквідували ефекти сполуки ELB139 в усіх трьох згаданих комбінаціях рецептора ГАМК_A. У α 1-вмісних рецепторів, позитивна модуляція імпульсів сполукою ELB139 спостерігалась при 0,3мМ і досягала максимуму при $1,6 \pm 0,08$ -крат при 30мМ (Фіг.5А), що становить приблизно половину максимального ефекту діазепаму ($2,2 \pm 0,9$ -крат при 1мМ діазепаму). У α 5 β 2 γ 2 рецепторів позитивна модуляція імпульсів сполукою ELB139 вперше спостерігалась при 1мМ і досягала при 30мМ максимуму ($1,4 \pm 0,06$ -крат), тобто ефективність і активність сполуки ELB139 були значно нижчими, аніж відповідні параметри діазепаму, який потенціював імпульси у дозі 10нМ і досягав свого максимального агоністичного ефекту ($2 \pm 0,05$ -кратне підсилення імпульсу) при 1мМ (Фіг.5Е). Нова сполука ELB139 позитивно модулювала ГАМК-індуковані імпульси у α 3-вмісних рецепторів при концентраціях більше 30нМ із найвищою ефективністю ($1,3 \pm 0,07$ -крат) при концентраціях вище 0,3мМ. У протилежність до цього, у разі діазепаму, позитивна модуляція імпульсів спостерігалась при концентраціях нижче 10нМ і досягала максимуму ($1,8 \pm 0,11$ -крат) при 1мМ.

Порівняно з прототипним бензодіазепіном, діазепамом, сполука ELB139 демонструвала α -субодиничну специфічність на $\alpha 2$ -вмісних рецепторах. На цьому рецепторі ГАМК_A діазепам демонстрував високу ефективність і активність із позитивною модуляцією імпульсів, яка вперше реєструвалась при концентраціях нижче 0,1 мкМ, і максимальний агонізм при 1 мкМ з 1,8-разовою потенціацією (Фіг.5В, Таблиця 1). У протилежність до цього, сполука ELB139 не викликала агоністичної або звертальної агоністичної модуляції ГАМК-індукованих імпульсів у рекомбінантних $\alpha 2\beta 2\gamma 2$ рецепторів ГАМК_A.

У разі $\alpha 4$ -вмісних рецепторів, діазепам не демонстрував значної модуляції ГАМК-індукованих імпульсів до концентрацій рівня 1 мкМ (Фіг.5D). Подібним чином, усі випробувані концентрації

сполуки ELB139 не виявляли впливу на імпульс CI⁻.

У той час як активність сполуки ELB139 на $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ і $\alpha 5\beta 2\gamma 2$ рецепторах була подібною, тобто у обох випадках значні агоністичні ефекти спостерігались при приблизно 1 мкМ сполуки ELB139, ефективність цього лікарського засобу для $\alpha 1$ -вмісних рецепторів була дещо вищою, ніж для $\alpha 5\beta 2\gamma 2$ рецепторів (1,6-кратна, порівняно з 1,4, дивись Таблицю 1). Цікаво те, що сполука ELB139 продемонструвала найвищу активність на $\alpha 3\beta 2\gamma 2$ рецепторах з ефектами потенціювання, що спостерігались уже при концентраціях вище 30 нМ, однак на цих рецепторах ця сполука продемонструвала найнижчу ефективність всього лише з 1,3-разовою потенціацією імпульсу.

Таблиця 1

EC₅₀ і значення потенціації сполуки ELB139 і діазепаму, застосованих разом із приблизною специфічною для субтипу рецептора EC₂₀ ГАМК. Зірочкою (*) позначені графічно визначені значення

$\alpha 1\beta 2\gamma 2$	ELB139		Діазепам	
	EC ₅₀ [мкМ]	Потенціація	EC ₅₀ [мкМ]	Потенціація
A1	3,8	1,6±0,08	0,035	2,2±0,9
$\alpha 2$	>>30	-	0,1	1,8±0,6
$\alpha 3$	0,06*	1,3±0,07	0,09	1,8±0,11
a4	>>30	-	>>1	-
a5	3,6	1,4±0,06	0,07	2±0,05

4.5. Висновки

На закінчення, новий лікарський засіб ELB139 позитивно модулював ГАМК-індуковані імпульси на $\alpha 1$, $\alpha 3$ і $\alpha 5\beta 2\gamma 2$ рецепторах ГАМК_A через сайт зв'язування бензодіазепінів із нижчою активністю і ефективністю, порівняно з діазепамом. Однак сполука ELB139 забезпечувала приблизно 50-кратну селективність щодо $\alpha 3$ -вмісних рецепторів ГАМК_A, порівняно з $\alpha 1$ і $\alpha 5$. Окрім того, у протилежність до діазепаму, сполука ELB139 не демонструвала агоністичного ефекту відносно $\alpha 2$ -вмісних рецепторів. Результати вказують на те, що розмаїта субтипowa селективність сполуки ELB139 щодо рецепторів ГАМК_A, порівняно з діазепамом, може пояснювати різниці їх активності in vivo.

Приклад 5

In vivo антидепресивна активність сполуки ELB139, як приклад субтипово-селективної частково агоністичної сполуки, що віддає перевагу альфа 3, на щурячій моделі депресії

Дію сполуки ELB139 досліджували за допомогою тесту з примусовим плаванням пацюків (FST). Депресивні розлади, у тому числі тяжкий депресивний розлад, є серйозними розладами, і обумовлюють втрату працездатності. Селективні інгібітори повторного поглинання серотоніну мають підвищену безпечність і прийнятність при проведенні антидепресивного лікування. Однак, піддатливість захворювання лікуванню часто ускладнюється негативними ефектами лікарських засобів, головним чином, на початкових стадіях лікування. Антидепресивна ефективність селективних інгібіторів повторного поглинання серотоніну, зокрема,

у хворих із тяжкою формою депресії, не перевершує антидепресивної ефективності трициклічних антидепресантів (поліпшення не спостерігається приблизно у 30% хворих) (Андерсон (Anderson), Томенсон (Thomenson), 1994; Блір (Blir), 2004; Андерсон (Anderson), Томенсон (Thomenson), 1994; Берк (Burke), Прескорн (Preskorn), 1995). З цієї причини значний інтерес викликають нові терапевтичні підходи до лікування депресії.

Для перевірки антидепресантів застосовують близько десятка тестів на тваринах (Крайан (Cryan) та інші, 2002). Тест із примусовим плаванням, що застосовувався для визначення неспецифічної стійкості до стресу, був описаний і піддавався оцінці Порсолт і співробітниками (Порсолт (Porsolt) та інші, 1977) для застосування на пацюках і на мишах (Порсолт (Porsolt), 1977). У тесті з примусовим плаванням застосовують поведінковий підхід, коли тварину примушують плавати до майже повного виснаження (приблизно 15хв.). Після періоду примусової активності на початку, гризун швидко адаптується і займає, як правило, нерухоме положення з мінімальною рухливістю для утримання на плаву (Порсолт (Porsolt) та інші, 1977). Придатність тесту з примусовим плаванням (тест Порсолту) і його взаємозв'язок із депресією піддавались екстенсивному вивченню (Крайан (Cryan) та інші, 2002; Уїллнер (Willner), 1984; Уїллнер (Willner), 1990) і зараз цей тест є відбірковим тестом для антидепресивних засобів. Незважаючи на те, що різні лабораторії внесли технічні модифікації до апарату, основні положення тесту залишились незмінними. На жаль, виявлення селективних

інгібіторів повторного поглинання серотоніну за допомогою традиційного тесту з примусовим плаванням є ненадійним, хоча і клінічно ефективним (Борсіні (Borsini), Мелі (Meli), 1988; Детке (Detke) та інші, 1995; Крайан (Cryan), 2002). Модифікація FST на основі докладного аналізу поведінки надає можливість більш надійного виявлення і відокремлення серотонінергічних і норадренергічних антидепресантів (Лакі (Lucki), 1997; Детке (Detke) та інші, 1995).

5.1. Матеріали і методи

Тварини

Для проведення експерименту використовували пацюків-самців лінії Wistar (Shoe: Wist, Dimed Schonwalde GmbH, Германия) масою 180-220г.

Тварини групами (по 5 голів на клітку) були розміщені у клітках 45см×60см×25см) при кімнатній температурі (22±2°C) із 12год. циклом чергування світла і темряви (світло вмикали о 06.00год., освітлення 170 люкс). Тварини мали вільний доступ до стандартного гранульованого корму (Altromin 1326) і води. Для надання тваринам можливості пристосування до нового середовища, пацюків розмістили у лабораторному виварі за два тижні до проведення тестів. Доставлених пацюків довільно розподілили на експериментальні групи. Тести проводили у звукоізолюваній яскраво освітленій кімнаті з 14.00 до 17.00.

Хімікати

Експериментальна сполука	ELB139
Хімічна назва	1-(p-хлорфеніл)-4-піперидин-1-іл-1,5-дигідроімідазо-2-он
Молекулярна маса	277,75
Партія	S306767
Виробник	Elbion AG
Еталонна сполука	флуоксетин
Хімічна назва	N-метил-γ-[4-(трифторметил)фенокси]бензолпропанамін
Молекулярна маса	345,8
Носій 1	Тилоза
Хімічна назва	Гідроксіетилцелюлоза
Партія	S22341743
Виробник	Merck Eurolab GmbH
Носій 2	PEG 300
Партія	53616433
Виробник	Merck Eurolab GmbH

Схема введення і дози лікарських препаратів
Сполуку ELB139 (10мг/кг, 30мг/кг) безпосередньо перед проведенням експериментів суспендували у 10% PEG+90% 0,5% гідроксіетилцелюлози. Для оцінки експериментальних методик були включені відомий антидепресант, флуоксетин (SSRI) (10мг/кг, 30мг/кг), і контролі, оброблені носієм (10% PEG+90% 0,5% гідроксіетилцелюлози.).

Усі тварини тричі одержували верум (verum) або носій: невдовзі після адаптаційного періоду (23год.), за 5год. і 1год. перед випробуванням. Усі лікарські засоби вводили пероральним шляхом у об'ємі 1мл/кг.

5.2. Експериментальна методика

Тварин піддавали випробуванню у скляному резервуарі (23см×30см, висота 40см), заповненому водою (22°C) на глибину 28см (тварини не торкались дна). Скляний резервуар освітлювався розсіяним світлом і його оточували затінювальні стінки темно-брунатного кольору (на відстані 20см від резервуару) для того, щоб тварини не бачили експериментатора. Експерименти проводили з 14.00 до 17.00, у цілому за описаним методом (Порсолт (Porsolt) та інші, 1979; Лакі (Lucki), 1997).

У перший день експерименту тварин обережно вносили до води на 15хв. для звикання. Після видалення з води тварин вміщували до стандартного ящика з органічного скла з підлогою, встеленою паперовими рушниками, під інфрачервоний обігрівач на 30хв. для висихання. Наступного дня їх ще раз обережно вносили до скляного резерву-

ару і спостерігали впродовж 5хв. Поведінка тварин реєструвалась на відеокамеру.

Після завершення 5хв. періоду, пацюків переносили до ящика з інфрачервоним обігрівачем і надавали їм можливість обсохнути.

Після завершення експерименту відеоплівки аналізувались вручну з реєстрацією тривалості такої поведінки: нерухомість: плавання і здійснення рухів, необхідних лише для утримання носу над поверхнею води. Плавання: коли тварина здійснювала активні рухи, тобто рухалась довкола резервуара з пірнанням. Видряпування: коли пацюки сильно рухали передніми лапами, виносячи їх з води і знову опускаючи їх до води, як правило, проти стінок.

5.3. Статистика

Дані подані у вигляді середньої величини±середня квадратична помилка середнього; група включала 10 пацюків. Порівняння між групами здійснювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу з подальшими міжгруповими порівняннями за методом Холма-Сідака. Результати вважались статистично значущими у разі P<0,05. Усі статистичні операції здійснювали із застосуванням програми SigmaStat, версія 3.0. Окремі дані наведені у Таблиці 2.4.

5.4. Результати

Під час проведення тесту з примусовим плаванням, сполука ELB139 не впливала на тривалість знаходження у нерухомому стані, але збільшувала тривалість плавання у дозі 30мг/кг (перорально), у той час як видряпувальна поведін-

ка залишалась незмінною (Фіг.6). Суб'єктивні спостереження дозволяють зробити припущення про помірну гіпоактивність (при 30мг/кг, перорально) після повернення до клітки.

Відомий антидепресант, флуоксетин, скорочував тривалість знаходження у нерухомому стані і подовжував тривалість плавання при 10мг/кг і 30мг/кг, тоді як видряпувальна поведінка залишалась незмінною (Фіг.7).

5.5. Обговорення

У нашому дослідженні сполука ELB139 продемонструвала ефект під час тесту з примусовим плаванням. Для одержання більшого обсягу інформації щодо можливих антидепресивно-подібних ефектів, поведінка під час тесту з примусовим плаванням піддавалась аналізу за більш складним методом, що надавало можливість розрізнення антидепресивних засобів різних класів (Лопес-Рубалкава (Lopez-Rubalcava), Лакі (Lucki), 2000; Лакі (Lucki), 1997). У відповідності з результатами попередніх досліджень, селективний інгібітор повторного поглинання серотоніну, флуоксетин, стимулював плавальну поведінку без посилення видряпувальної поведінки.

Впливи сполуки ELB139 на параметри, визначені під час проведення тесту з примусовим плаванням, є подібним до відповідних впливів флуоксетину (зміни у плаванні з меншим впливом на тривалість знаходження у стані нерухомості), а не до впливів дезипраміну (desipramine) (зміни знаходження у стані нерухомості і видряпування) (Реке (Reh) та інші, у публікації). Можна, таким чином, припустити, що дія сполуки ELB139 може залучати серотонінергічну систему. Було висунуто припущення, що ослаблена серотонінергічна передача нервових імпульсів відіграє ключову роль у етіології депресії. Це було встановлено, головним чином, за клінічною ефективністю антидепресантів (селективні інгібітори повторного поглинання серотоніну) третього покоління, які стимулюють серотонінергічну передачу (Бейк (Beique) та інші, 2000; Блір (Blir), 2001). Сполука ELB139 добре переносилась у обох дозах (10мг/кг і 30мг/кг).

Під час випробувань пацюки, які одержали сполуку ELB139 у дозі 10мг/кг або 30мг/кг, не демонстрували подовження часу знаходження у нерухомому стані, але при дозі 30мг/кг реєструвалось незначне, але статистично значуще скорочення часу видряпування. Це може обумов-

люватись ефектом ослаблення рухової активності сполукою ELB139. Спостерігалось також незначне зниження активності пацюків після їх повернення до клітки. Однак скорочення часу видряпування супроводжується одночасним значним збільшенням тривалості плавання, завдяки чому загальна активність пацюків видається незмінною. Таким чином, сполука ELB139 не викликала значного зниження рухової активності у тесті відкритого поля і на різних тваринних моделях тривоги (Ланген (Langen), 2002; Ланген (Langen), 2003a+b). Однак, у протилежність до флуоксетину, сполука ELB139 не підвищувала загальної активності пацюків.

Підсумовуючи, з огляду на значне посилення плавальної поведінки при дозі 30мг/кг (перорально), сполука ELB139 може розглядатись як кандидат для застосування при антидепресивному лікуванні.

Приклад 6

Звертання впливу сполуки ELB139 на рівні серотоніну за допомогою антагоніста бензодіазепінів флумазенілу (flumazenil)

6.1. Матеріали і методи

Тварини

Для проведення експерименту використовували пацюків-самців лінії Wistar (CrI:(WI) BR, Charles River, Sulzfeld, Германія) масою від 200г до 260г. Тварини групами по 5 голів були розміщені у клітках за стандартних умов із 12год. циклом чергування світла і темряви (світло вмикали о 06.00) з доступом до їжі (гранульований корм Pellets, ssniff M/R 15, Spezialdiat GmbH, Soest/Westfalen) і води ad libitum.

Хімікати

Сполука ELB139 (1-(p-хлорфеніл)-4-піперидин-1-іл-1,5-дигідроімідазо-2-он, молекулярна маса 277,75) була виготовлена фірмою Elbion AG. Флумазеніл (8-фторо-5-метил-6-оксо-5,6-дигідро-4H-2,5,10b-триаза-бензо[e]азулен-3-карбоксилікацидентилефір) одержали від фірми Tocris (розповсюджується фірмою Biotrend Chemikalien GmbH (Koln, Германія)). Усі інші застосовані хімікати одержали від фірми Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Германія) або від фірми Merck (Германія).

Схема введення і дози лікарських препаратів

Шлях введення: внутрішньоочеревинно.

Застосований об'єм: 0,5мл/100г.

Речовина	Доза [мг/кг]	Тривалість попередньої обробки [хв.]	Кількість застосувань [n]
Флумазеніл	10	Через 40хв. після введення ELB139	1
ELB139	30	0	1

6.2. Одержання сполук

Сполуку ELB139 безпосередньо перед проведенням експерименту суспендували у 90% 0,5% гідроксietилцелюлози і 10% PEG 300, завдяки чому для кожної речовини і дози одержали об'єм введення 0,5мл/100г. Галоперидол (розчин для ін'єкцій) розбавляли фізіологічним розчином, завдяки чому одержали об'єм введення 0,5мл/100г. Флумазеніл розбавляли фізіологічним розчином, завдяки чому одержали об'єм введення 0,5мл/100г. Розчин і суспензія знаходились на ма-

гнітній мішалці перед і під час введення доз. Гідроксietилцелюлозу розчиняли у дистильованій воді.

6.3. Експериментальна методика Хірургічна процедура

За день до експерименту пацюків-самців анастезували хлоралгідратом (3,6%, 1мл/100г, внутрішньоочеревинно) і розмістили у стереотаксичній рамці для імплантування мікродіалізної напрямної канюлі (CMA/12, Carnegie Medicine, Швеція). Волосисту частину шкіри голови надрізували посередині у передньо-задньому напрямку між ламбдою і

брегмою і у черепі висвердлювали отвір невеликого діаметра. Стереотаксичні координати: AP=+1,0мм, L=-3,0мм від брегми і 1,5мм від поверхні черепа до смугастого тіла за атласом Паксинос (Paxinos) і Уотсон (Watson) (1986) (1). Для прикріплення прямої канюлі до черепа застосовували стоматологічний цемент (Sinfony (2)) і анкерні гвинти. Під час проведення хірургічного втручання ректальну температуру підтримували на рівні 37°C за допомогою ковдри для нагрівання.

Мікродіаліз

За день до проведення експерименту мікродіалізний зонд (CMA/12, довжина мембрани 4мм, Carnegie Medicin, Швеція) вводили до смугастого тіла через пряму канюлю. У день проведення експерименту зонд піддавали перфузії розчином Рінгера-Локка (148мМ NaCl, 4мМ KCl, 2,4мМ CaCl₂, pH6,0). Швидкість потоку (1мкл/хв.) надавала можливість збирання до мікропробірок 20мкл зразків кожні 20хв. Мікропробірки до проведення аналізу зберігали у колекторі фракцій (CMA/170) при температурі 8°C. Завдяки вертлюжному з'єднанню, пристрій для перфузії дозволяв тварині вільно рухатись у напівкруглому резервуарі. Після 1год. адаптаційного періоду збирали 3 послідовні 20хв. фракції для встановлення стабільного вихідного рівня вивільнення нейромедіатору.

Після цього вводили сполуку ELB139 (30мг/кг) або еквівалентний об'єм 0,5% тилози, відповідно. Потім збирання зразків продовжували щонайменше впродовж 220хв.

Аналіз діалізатів

DOPAC (3,4-дигідроксифенілоцтова кислота)	1000, 500, 250, 125, 62,5нМ
DOPAMINE (3-гідрокситираміну гідрохлорид)	8, 4, 2, 1, 0,5нМ
HIAA (5-гідрокси-3-індолоцтова кислота)	200, 100, 50, 25, 12,5нМ
HVA (гомованілінова кислота)	800, 400, 200, 100, 50нМ
SEROTONIN (5-гідрокситриптамінокреатинінсульфат)	0,15, 0,075, 0,0375, 0,01875, 0,009375нм

Перед імплантуванням та після видалення мікродіалізного зонда, регенерацію здійснювали за допомогою розчину, що містив 2000нм DOPAC, 40нм допаміну, 1000нм HIAA, 2000нм HVA і 0,8нм серотоніну. Швидкість регенерації зондів знаходилась у межах 5-20%.

Гістологія

Після завершення експерименту головний мозок пацюків видалляли і піддавали вторинній фіксації у формаліні (10%) впродовж приблизно 10 днів. Головний мозок розрізали за допомогою віброножа для одержання зрізів (TSE) і забарвлювали толуїдиновим синім для перевірки відповідного положення зондів.

6.4. Статистика

Вихідний рівень вивільнення 5-HT показав міжіндивідуальні різниці. З цієї причини дані по кожній тварині виражали у відсотках. Дані діалізатів перед введенням речовин усереднювали і середнє значення приймали за 100%; усі індивідуальні значення обчислювали відповідним чином.

Результати піддавали двофакторному дисперсійному аналізу (ANOVA), де двома факторами виступали час і лікарський засіб. Для індивідуального порівняння застосовували критерій Такі. Р<0,05 вважали статистично значущим.

Діалізати піддавали безпосередньому аналізу засобами високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою і електрохімічним детектуванням (HPLC-EC). Зразки відокремлювали на колонці ZORBAX SB-Aq (2,1мм (внутрішній діаметр)×100мм) (Agilent Technologies). До 20хв. фракції додавали 1мкл 1% перхлорної кислоти і 10мкл цієї суміші вводили до системи HPLC.

Рухома фаза містила:

KH ₂ PO ₄	50мМ
Натрієва сіль октан-1-сульфоїкислоти (NOS)	2,2мМ
EDTA (етилендіамінтетраоцтова кислота)	0,086мМ
2MH ₃ PO ₄	5мл
Метанол (MeOH)	83мл
Ацетонітрил	10мл
	pH3,5

Серотонін пропускали зі швидкістю потоку 0,23мл/хв при температурі 38°C; термостат для зберігання зразків мав температуру 8°C.

У нічний час швидкість потоку знижували до 0,1мл/хв. Катехоламіни окиснювали при 500 мВ (мікродіалізна комірка модель 5014 В, ESA). Допак вимірювали при 200нА, допамін при 2нА, HIAA (5-окси-3-індолоцтова кислота) при 100нА, HVA (гомованілінова кислота) при 2нА і серотонін при 500пА.

Для калібрування системи регулярно пропускали зовнішні стандарти у 5 концентраціях кожний:

6.5. Результати

Сполука ELB139 індукувала явно виражене підвищення позаклітинних рівнів серотоніну у смугастому тілі пацюків, порівняно із середнім вихідним рівнем. У разі введення флумазенілу у дозі 10мг/кг (внутрішньоочеревинно) через 40хв. після введення сполуки ELB139 у дозі 30мг/кг (внутрішньоочеревинно), підвищення позаклітинного рівня серотоніну не тільки зворотилось, але рівень серотоніну опускався навіть нижче середнього вихідного рівня. На кінець періоду реєстрації (3год.), рівень серотоніну знову повернувся до середнього вихідного рівня.

Приклад 7

Звертання антипсихотичного ефекту сполуки ELB139 за допомогою антагоніста бензодіазепінів флумазенілу

7.1. Матеріали і методи

Тварини

Для проведення експерименту використовували пацюків-самиць лінії Wistar (CrI:(WI) BR, Charles River, Sulzfeld, Германія) масою від 168г до 217г. Тварини групами по 5 голів були розміщені у клітках за стандартних умов із 12 годинним циклом чергування світла і темряви (світло вмикали о 06.00год.) із доступом до їжі (гранульований корм

Pellets, ssniff M/R 15, Spezialdiat GmbH, Soest/Westfalen) і води ad libitum.

Хімікати

Сполука ELB139 (1-(p-хлорфеніл)-4-піперидин-1-іл-1,5-дигідроімідазо-2-он, молекулярна маса 277,75) була виготовлена фірмою Elbion AG. Галоперидол (4-(4-[4-хлорфеніл]-4-гідрокси-1-піперидиніл)-1-(4-фторфеніл)-1-нуганон, молекулярна маса 375,9) одержали від фірми Ratiopharm GmbH (Ulm, Германия), сполуку МК-801 (дізоцилпін (dizocilpine), молекулярна маса 337,37) і флумазені-

ніл (8-фторо-5-метил-6-оксо-5,6-дигідро-4Н-2,5,10b-триаза-бензо[е]азулен-3-карбоксихлоридфеніл) одержали від фірми Tocris (розповсюджується фірмою Biotrend Chemikalien GmbH (Koln, Германия)). Усі інші застосовані хімікати одержали від фірми Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Германия) або від фірми Merck (Германия).

7.2. Схема введення і дози лікарських препаратів

Застосований об'єм: 0,5мл/100г.

Речовина	Кількість тварин [n]	Доза [мг/кг]	Попередня обробка [хв.]	Кількість застосувань [n]	Шлях введення
МК-801	6	0,1	10	1	Внутрішньо-очеревинний
ELB139	6	30	60	1	Внутрішньо-очеревинний
ELB139+ флумазеніл	6	30	60	1	Пероральний
Галоперидол	9	0,5	20	1	Внутрішньо-очеревинний
Галоперидол	4	0,5	30	1	Внутрішньо-очеревинний
+флумазеніл		5	60	1	Внутрішньо-очеревинний

7.3. Одержання сполук

Сполуку ELB139 безпосередньо перед проведенням експерименту суспендували у 90% 0,5% гідроксietилцелюлози і 10% PEG 300, завдяки чому для кожної речовини і дози одержали об'єм введення 0,5мл/100г. Галоперидол (розчин для ін'єкцій) розбавляли фізіологічним розчином, завдяки чому одержали об'єм введення 0,5мл/100г. Флумазеніл і сполуку МК-801 розбавляли фізіологічним розчином, завдяки чому одержали об'єм введення 0,5мл/100г. Розчини і суспензії знаходились на магнітній мішалці перед і під час введення доз. Гідроксietилцелюлозу розчиняли у дистильованій воді.

Окрім пацюків, що входили до групи, призначеної для перевірки галоперидолу, які одержали галоперидол за 30хв. і сполуку МК-801 за 10хв. перед проведенням випробувань, тварини інших експериментальних груп одержали галоперидол, сполуку ELB139 або носій за 60хв. перед проведенням випробувань, фізіологічний розчин або флумазеніл за 20хв. перед проведенням випробувань і сполуку МК-801 за 10хв. перед проведенням випробувань.

7.4. Експериментальна методика

Поведінка, індукована сполукою МК-801 (антагоніст NMDA), є загальноприйнятною як модель

психозу на пацюках. Сполука МК-801, у разі внутрішньоочеревинного введення, індукує у пацюків стереотипії, гіперактивність і атаксію.

Рухова активність пацюків реєструється апаратом MotiTest (TSE, Bad Homburg, Германия). Експериментальна ділянка являє собою квадратний майданчик (45см×45см) із захисними стінками з органічного скла (висотою 20см), де пацюки могли вільно рухатись. Рухи у горизонтальній площині реєструвались 32 інфрачервоними фотоелементами, розміщеними вздовж нижньої частини кожної стінки майданчика. Рухи у вертикальній площині (вертикальні стояки) реєструвались горизонтальним рядом з 32 інфрачервоних фотоелементів на висоті 12см від підлоги. Комп'ютерна програма "ActiMot" (TSE, Bad Homburg, Германия) вимірювала наведені нижче параметри:

1) активний час [s (с)];

2) загальна подолана відстань [m (м)].

Стереотипії, поділені на стереотипне обнюхування і інші стереотипії, і атаксія оцінювались експериментатором у балах кожні 5хв. впродовж 1год. (12 інтервалів) за методом, описаним Андіне (Andine) та іншими (1999). Бальні оцінки 12 інтервалів для кожного параметра додаються.

Оцінка у балах	Стереотипне обнюхування	Інші стереотипії	Атаксія
0	Відсутність стереотипного обнюхування	Відсутність інших стереотипій	Нормальне управління тілом
1	Періодичне обнюхування (вільний інтервал>5с)	Періодичні стереотипії (вільний інтервал>5с)	Схильність до падіння під час руху
2	Постійне обнюхування	Постійні стереотипії	Падіння під час
3			Майже повна нездатність рухатись

У день проведення експерименту пацюків-самиць переносять до лабораторії, і у відповідний час до початку тестування вводять експериментальну сполуку, контрольну сполуку або носій. Спо-

луку МК-801 вводять (0,2мг/кг, внутрішньоочеревинно) за 10хв. до проведення тесту.

На початку тесту пацюків вміщують у центрі квадратної площинки апарату MotiTest. Поведінку пацюків реєструють впродовж 1год. Після кожної

серії експериментів тварин видаляють, клітки ретельно чистять і висушують.

7.5. Статистика

Результати обнюхування, інших стереотипів і атаксії піддавали однофакторному дисперсійному аналізу (ANOVA). Для індивідуального порівняння застосовували критерій Такі. Результати активності і загальної подоланої відстані піддавали двофакторному дисперсійному аналізу (ANOVA) (сполука×час). Для індивідуального порівняння застосовували критерій Стюдента-Ньюмена-Кулса. $P < 0,05$ вважали статистично значущим.

7.6. Результати

Галоперидол (0,5мг/кг, внутрішньоочеревинно) значною мірою звертав підвищену активність, підвищену подолану відстань і обнюхування (стереотипії), індуковані сполукою МК-801 (Фіг.1). Інші стереотипії, індуковані сполукою МК-801, піддавались незначному звертанню галоперидолом у дозі 0,5мг/кг. Флумазеніл у дозі 5мг/кг на ці ефекти галоперидолу не впливав. МК-801-індукована атаксія була лише маргінально знижена галоперидолом, однак була значною мірою звернена введенням комбінації галоперидолу і флумазенілу (Фіг.8).

Дані щодо сполуки ELB139 одержали під час проведення двох окремих випробувань, які були здійснені двома різними лаборантами (листопад 2003 року і січень 2004 року). Два згадані окремі випробування і сума обох випробувань описані і наведена на Фіг.9 та Фіг.10а і Фіг.10b.

Сполука ELB139 (30мг/кг, перорально) значною мірою звертала стереотипне обнюхування у кожному з випробувань і при підсумовуванні даних обох випробувань. Ефект сполуки ELB139 чітко антагонізувався флумазенілом у другому випробуванні і значною мірою звертався у першому випробуванні і у сумі обох випробувань (Фіг.9).

Інші стереотипії, індуковані сполукою МК-801, дещо зменшувались у першому і значною мірою звертались у другому випробуванні і під час підсумовування даних обох випробувань сполукою ELB139 у дозі 30мг/кг (перорально). Цей ефект сполуки ELB139 достатньою мірою підсилювався флумазенілом (5мг/кг) під час першого випробування і чітко звертався під час другого випробування, завдяки чому, при підсумовуванні даних, жодної зміни ефекту сполуки ELB139 флумазенілом більше не спостерігалось. Причиною цих суперечливих результатів було, ймовірно, нечітке визначення словосполучення "інші стереотипії" у другому випробуванні (Фіг.9).

Сполука ELB139 у дозі 30мг/кг (перорально) майже не впливала на атаксію, індуковану сполукою МК-801 під час першого випробування (листопад 2003 року). Під час другого випробування (січень 2004 року) цей ефект був вираженим сильніше, але все ще недостатньо значуще, завдяки чому, при підсумовуванні обох випробувань, можна було спостерігати лише незначне ослаблення атаксії. Ефект ослаблення атаксії сполукою ELB139, що спостерігався під час другого випробування, звертався флумазенілом у дозі 5мг/кг (внутрішньоочеревинно). Підсумовування даних

обох випробувань продемонструвало маргінальний звертальний ефект флумазенілу (Фіг.9).

МК-801-індукована гіперактивність реєструвалась як активність і подолана відстань, і описувалась у 5хв. інтервалах. Результати аналізу кривих загального часу показали, що сполука ELB139 у дозі 30мг/кг (перорально) чітко ослаблювала активність, індуковану сполукою МК-801, у другому випробуванні і значно ослаблювала її у першому випробуванні, а також при підсумовуванні даних обох випробувань (двофакторний дисперсійний аналіз, Фіг.10а). У обох випробуваннях і у сумі обох випробувань вплив сполуки ELB139 на активність був значною мірою звернений флумазенілом у дозі 5мг/кг (внутрішньоочеревинно) (Фіг.10а).

Результати аналізу кривої загального часу (двофакторний дисперсійний аналіз, Фіг.10а) показали, що МК-801-індуковане збільшення подоланої відстані було значною мірою звернене сполукою ELB139 у обох випробуваннях і за сумою обох випробувань. Цей ефект був значною мірою звернений флумазенілом в усіх випробуваннях і при підсумовуванні даних обох випробувань (Фіг.10а).

Результати аналізу окремих часових точок показали, що вплив сполуки ELB139 на активність і подолану відстань був більш вираженим впродовж першої половини години (Фіг.10b).

Посилання:

Abi-Saab W., D'Souza D.C., Moghaddam B. and Krystal J.H. (1998). The NMDA antagonist model for schizophrenia: promise and pitfalls. *Pharmacopsychiatry* 31 Suppl 2: 104-109.

American Psychiatric Association (1994). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th edn. American Psychiatric Press, Washington, DC.

Anderson I.M., Tomenson B.M. The efficacy of selective serotonin re-uptake inhibitors in depression: a meta-analysis of studies against tricyclic antidepressants. *J. Psychopharmacol* 1994; 4: 238-249.

Andine P., Widermark N., Axelsson R., Nyberg G., Olofsson U., Martensson E., Sandberg M. (1999). Characterization of MK-801-induced Behavior as a putative rat model of psychosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290: 1393-1408.

Arnold S.E. (1999). Neurodevelopmental abnormalities in schizophrenia: insights from neuropathology. *Dev Psychopathol* 11: 439-56.

Atack J.R. (2003). Anxiolytic compounds acting at the GABA (A) receptor benzodiazepine binding site. *Curr Drug Target CNS Neurol Disord* 2: 213-232.

Bailer J., Thurm-Mussgay I., Rey E.R. (1999). Schizophrenic. In: H. Reinecker (Hrsg.), *Fallbuch der klinischen Psychologie*, 1Eap 20, Göttingen: Hogrefe-Verlag: 343-66.

Beique J., Blier P., Debonnel G. Effects of sustained administration of the serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor venlafaxine: I. In vivo electrophysiological studies in the rat. *Neuropharmacology* 2000; 39: 1800-1812.

Benavides J., Peny B., Durand A., Arbilla S. and Scatton B. (1992). Comparative in vivo and in vitro regional selectivity of central X (benzodiazepine) site

ligands in inhibiting [^3H] flumazenil binding in the rat central nervous system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263, 884-896.

Benes F.M. (1993). The relationship between structural brain imaging and histopathologic findings in schizophrenia research. *Harv Rev Psychiatry* 1: 100-109.

Blier P. Pharmacology of rapid-onset antidepressant treatment strategies. *J. Clin. Psychiat.* 2001; 62 Suppl. 15: 12-17. Atack JR (2003). Anxiolytic compounds acting at the GABA (A) receptor benzodiazepine binding site. *Curr. Drug Target CNS Neurol. Disord.* 2: 213-232.

Borsini F., Meli A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity. *Psychopharmacology* 1988; 94: 147-60.

Capuano B., Crosby I.T., Lloyd E.J. (2002). Schizophrenia: genesis, receptorology and current therapeutics. *Curr. Med. Chem.* 9: 521-48.

Chambers M.S., Collins I.J., Goodacre S.C., Hallett D.J., Jones P., Keown L.E., Maxey R.J., Street L.J. (14.09.2001). World patent no. W02001044249. New triazolo-pyrimidine compounds active as GABAA receptor ligands, useful for treating e.g. anxiety, neuroses, convulsions, migraine, depression, psychotic disorders, neurodegeneration pain, emesis or eating disorders.

Costa E. and Guidotti A. (1996). Benzodiazepines on trial: a research strategy for their rehabilitation. *Trends Pharmacol. Sci.* 17: 192-200.

Crestani F., Martin J.R., Mohler H., Rudolph U. (2000). Mechanism of action of the hypnotic zolpidem in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 131: 1251-1254.

Cryan J.F., Markou A., Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol. Sci.* 2002; 23: 238-245.

Davidson G.C., Neale J.M. (1988) *Klinische Psychologie*, Kap. 14, München: Psychologische Verlags Union: 429-74.

Dawson G.R. (23.01. 1998). World patent no. WO 9937370. Product for treating e.g. disorders of the central nervous system.

DDG eV = Deutsche Dystoniegesellschaft eV

Delgado P., Moreno F. (1999). Antidepressants and the brain. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 14 Suppl. 1: S9-S16.

Detke M.J., Rickels M., Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology* 1995; 121: 66-72.

Dresser D., Munchau A., Bhatia K.P., Quinn N.P., Bigalke H. (2002). Antibody-induced botulinum toxin therapy failure: can it be overcome by increased botulinum toxin doses? *Eur. J. Neurosci.* 14: 118-21.

Dubinsky B., Vaidya A.H., Rosenthal D.I., Hochman C., Crooke J.J., DeLuca S., DeVine A., Cheo-Isaacs C.T., Carter A.R., Jordan A.D., Reitz A.B., Shank R.P. (2002). 5-ethoxymethyl-7-fluoro-3-oxo-1, 2, 3, 5-tetrahydrobenzo [4,5] imidazo[1,2-a]pyridine-4-N-(2-fluorophenyl)carboxamide (RWJ-51204), a new nonbenzodiazepine anxiolytic. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303: 777-790.

Fahn S. (1987). Systemic therapy of dystonia. *Can. J. Neurol. Sci.* 14: 528-32.

Fredow G., Loscher W. (1991). Effects of pharmacological manipulation of GABAergic neurotransmission in a new mutant hamster model of paroxysmal dystonia. *Eur. J. Pharmacol.* 192: 207-219.

Friedman J., Standaert D.G. (2001). Dystonia and its disorders. *Neurol. Clin.* 19: 681-705.

Gao B., Fritschy J.M., Benke D., Mohler H. (1993). Neuron-specific expression of GABAA-receptor subtypes: differential association of the alpha 1- and alpha 3-subunits with serotonergic and GABAergic neurons. *Neuroscience* 54: 881-892.

Gerlach J. (2002). Life is not so easy... *Psychopharmacology* 162: 1-2.

Gernert M., Bennay M., Fedorowicz M., Rehders J.H., Richter A. (2002). Altered discharge pattern of basal ganglia output neurons in an animal model of idiopathic dystonia. *J. Neurosci.* 22: 7244-53.

Goodacre S.C., Hallett D.J., Street L.J. (07.02. 2002). World patent no. WO 2002010170. New imidazo. pyrazine derivatives are useful as ligands for GABA receptors in treatment of e.g. anxiety, convulsion, panic disorder, social phobias, obsessive compulsive disorder, anxiety, migraine and schizophrenia.

Graeff F.G., Guimaraes F.S., De Andrade T.G., Deakin J.F.W. (1996). Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. *Pharmacol Biochem Behav* 54: 129-141.

Greene P. (1992). Baclofen in the treatment of dystonia. *Clin. Neuropharmacol.* 15: 276-88.

Guyon A., Laurent S., Paupardin-Tritsch D., Rossier J., Eugene D. (1999). Incremental conductance levels of GABAA receptors in dopaminergic neurones of the rat substantia nigra pars compacta. *J. Physiol.* 516: 719-737.

Hamann M., Richter A. (2002). Effects of striatal injections of GABAA receptor agonists and antagonists in a genetic animal model of paroxysmal dystonia. *Eur. J. Pharmacol.* 443: 59-70.

Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B. and Sigworth F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfugers Arch.* 391, 85-100.

Herrero M.T., Barcia C., Navarro J.M. (2002). Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Childs Nerv. Syst.* 18: 386-404.

Hevers W. and Luddens H. (1998). The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol. Neurobiol.* 18, 35-86.

Hsiung G.Y., Das S.K., Ranawaya R., Lafontaine A.L., Suchowersky O. (2002). Long-term efficacy of botulinum toxin A in treatment of various movement disorders over a 10-year period. *Mov. Disord.* 17: 1288-93.

Jentsch J.D., Roth R.H. (1999). The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20: 201-25.

Jones N., King S.M., Duxon M.S. (2002). Further evidence for the predictive validity of the unstable elevated exposed plus-maze, a behavioural model of extreme anxiety in rats : differential effects of fluoxetine and citalopram. *Behav Pharmacol.* 13: 525-535.

Kawata Y., Okada M., Murakami T., Kamata A., Zhu G., Kaneko S. (2001). Pharmacological discrimination between effects of carbamazepine on hippocampal basal, Ca (2+)- and K (+)-evoked serotonin release. *Br. J. Pharmacol.* 133: 557-567.

Klein C., Ozelius U. (2002). Dystonia: clinical features, genetics, and treatment. *Curr Opin Neurol* 15: 491-7.

Korpi E.R. and Loden H. (1993). Regional-aminobutyric acid sensitivity of t-butylbicyclophosphorothionate binding depends on γ -aminobutyric acid receptor α subunit. *Mol. Pharmacol.* 44, 87-92.

Krack F., Vercueil L. (2001). Review of the functional surgical treatment of dystonia. *Eur. J. Neurol.* 8: 389-99.

Lahti A.C., Weiler M.A., Tamara Michaelidis B.A., Parwani A. and Tamminga C.A. (2001). Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology* 25: 455-467.

Langen B. (2002). Effect of AWD 131-139, 131-175 and 34-117 on anxiety-related behaviour in different animal models of anxiety, elbion AG, Pharmacological Research, Study report no.: E131-00139/PH-16/02, dated 2002-Oct-17.

Langen B. (2003a). Effect of E131-00139 on anxiety-related behaviour in two rodent models of anxiety, elbion AG, Pharmacological Research, Study report no.: E131-00139/PH-27/03, dated 2003-Sep-15.

Langen B. (2003b). Effect of flumazenil on the anxiolytic activity of E131-00139 in the elevated plus maze test in rats, elbion AG, Pharmacological Research, Study report no.: E131-00139/PH-28/03, dated 2003-Sep-15.

Li X.M., Perry K.W., Fuller R.W. (1996). On the in-vivo modulation of neostriatal dopamine release by fluoxetine and 5-hydroxy-L-tryptophan in conscious rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 48: 825-828.

Lindenmayer J.P., Czobor P., Volavka J., Lieberman J.A., Citrome L., Sheitman B., Chakos M., McEvoy J.P. (2002). Olanzapine in refractory schizophrenia after failure of typical or atypical antipsychotic treatment: an open-label switch study. *J. Clin. Psychiatry* 63: 931-5.

Lopez-Rubalcava C., Lucki I. Strain differences in the behavioral effects of antidepressant drugs in the rat forced swimming test. *Neuropsychopharmacology* 2000; 22: 191-199.

Low K., Crestani F., Keist R., Benke D., Brunig I., Benson J.A., Fritschy J.M., Rulic T., Bluethmann H., Mohler H., Rudolph U. (2000). Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* 290: 131-134.

Lucki I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav. Pharmacol.* 1997; 8: 523-532.

Luddens H. and Korpi E.R. (1995). GABA antagonists differentiate between recombinant GABAA/benzodiazepine receptor subtypes. *J. Neurosci* 15, 6957-6962.

Luddens H., Korpi E.R. and Seeburg P.H. (1995). GABAA/benzodiazepine receptor heterogeneity: neurophysiological implications. *Neuropharmacol.* 34, 245-254.

McKernan R. (30.09.1998). Great Britain patent no. GB2342043. Use of triazolo-pyridazine derivatives for the treatment of hearing loss, especially age-related hearing impairment and tinnitus.

Murakami T., Okada M., Kawata Y., Zhu G., Kamata A., Kaneko S. (2001). Determination of effects of antiepileptic drugs on SNARE-mediated hippocampal monoamine release using in vivo microdialysis. *Br. J. Pharmacol.* 134: 507-520.

Nutt D.J., Forshall S., Bell C., Rich A., Sandford J., Mash J., Argyropoulos S. (1999). Mechanism of action of selective serotonin reuptake inhibitors in the treatment of psychiatric disorders. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 9 Suppl. 3: S81-S86.

Nyberg S., Olsson H., Nilsson U., Maehlum E., Halldin C., Farde L. (2002). Low striatal and extrastriatal D2 receptor occupancy during treatment with the atypical antipsychotic sertindole. *Psychopharmacology* 162: 37-41.

Okada M., Kawata Y., Kiryu K., Mizuno K., Wada K., Inomata H., Tasaki H., Kaneko S. (1997). Effects of non-toxic and toxic concentrations of phenytoin on monoamines levels in rat brain. *Epilepsy Res.* 28: 155-163.

Owens M.J., Nemeroff C.B. (1994). Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. *Clin. Chem.* 40: 288-295.

Pauls D.L., Korczyn A.D. (1990). Complex segregation analysis of dystonia pedigrees suggests autosomal dominant inheritance. *Neurology* 40: 1107-10.

Paxinos G. and Watson C. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. Academic Press inc. London.

Pei Q., Zetterstrom T., Fillenz M. (1989). Both systemic and local administration of benzodiazepine agonists inhibit the in vivo release of 5-HT from ventral hippocampus. *Neuropharmacology* 28: 1061-1066.

Platt D.M., Rowlett J.K., Spealman R.D., Cook J., Ma C. (2002). Selective antagonism of the ataxic effects of zolpidem and triazolam by the GABAA/ α -preferring antagonist beta-CCt in squirrel monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* 164: 151-159.

Porsolt R.D., Bertin A., Blavet N., Deniel M., Jalfre M. Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. *Eur. J. Pharmacol.* 1979; 57: 201-210.

Porsolt R.D., Le Pichon M., Jalfre A.A. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 1977; 266: 730-732.

Porsolt R.D. Animal models of depression: utility for transgenic research. *Rev. Neurosci* 2000; 11: 53-58.

Prasad S., Semwal P., Deshpande S., Bhatia T., Nimgaonkar V.L., Thelma B.K. (2002). Molecular genetics of schizophrenia: past, present and future. *J. Biosci.* 27: 35-52.

Pritchett D.B. and Seeburg P.H. (1990).-aminobutyric acidA receptor OC5-subunit creates novel type 11 benzodiazepine receptor pharmacology. *J. Neurochem.* 54, 1802-1804.

Pritchett D.B., LuddensH. and Seeburg P.H. (1989). Type I and type 11 GABAA-benzodiazepine receptors produced in transfected cells. *Science* 245, 1389-1392.

Pritchett D.B., Sontheimer H., Shivers B.D., Ymer S., Kettenmann H., Schofield P.R. and Seeburg P.H. (1989). Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature* 338, 582-585.

Rawicki B. (1999). Treatment of cerebral origin spasticity with continuous intrathecal baclofen delivered via an implantable pump: long-term follow-up review of 18 patients. *J. Neurosurg.* 91: 733-6.

Rex A., Schickert R., FinkH. Antidepressant-like effect of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) in the forced swim test in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2004; in press.

Richter A, Loscher W. (1999). Gabapentin decreases the severity of dystonia at low doses in a genetic animal model of paroxysmal dystonic choreoathetosis. *Eur. J. Pharmacol.* 369: 335-8.

Richter A, Loscher W. (2000). Paradoxical aggravation of paroxysmal dystonia during chronic treatment with phenobarbital in a genetic rodent model. *Eur. J. Pharmacol.* 397: 343-50.

Rodriguez-Pallares J., Caruncho H.J., Lopez-Real A, Wojcik S., Guerra M.J., Labandeira-Garcia J.L. (2001). Rat brain cholinergic, dopaminergic, noradrenergic and serotonergic neurons express GABAA receptors derived from the alpha3 subunit. *Receptors Channels* 7: 471-478.

Sams-Dodd F. (1998). Effects of diazepam, citalopram, methadone and naloxone on PCP-induced stereotyped behaviour and social isolation in

the rat social interaction test. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23: 287-93.

Sawa A., Snyder S.H. (2002). Schizophrenia: diverse approaches to a complex disease. *Science* 296: 692-695.

Siep E., RichterA., LoscherW., Speckmann E.J., Kohling R. (2002). Sodium currents in striatal neurons from dystonic dt (sz) hamsters: altered response to lamotrigine. *Neurobiol. Dis.* 9: 258-68.

Stokes P.E., Holtz A. (1997). Fluoxetine tenth anniversary update: the progress continues. *Clin. Ther.* 19: 1135-1250.

Tao R., Auerbach S.B. (2000). Regulation of serotonin release by GABA and excitatory amino acids. *J. Psychopharmacol.* 14: 100-113.

Tauber M., Calame-Droz E., Prat L, Rudolph U., Crestani F. (2003). alpha2-gamma-Aminobutyric acid (GABA)A receptors are the molecular substrates mediating precipitation of narcosis but not of sedation by the combined use of diazepam and alcohol in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 18: 2599-2604.

Taylor CP., GeeN.S., SuT.Z., Kocsis J.D., Welty D.F., Brown J.P., Dooley D.J., Boden P., Singh L. (1998). A summary of mechanistic hypotheses of gabapentin pharmacology. *Epilepsy Res.* 29: 233-249.

Thyagarajan D. (2001). Genetics of movement disorders: an abbreviated overview. *Stereotact. Funct. Neurosurg.* 77: 48-60.

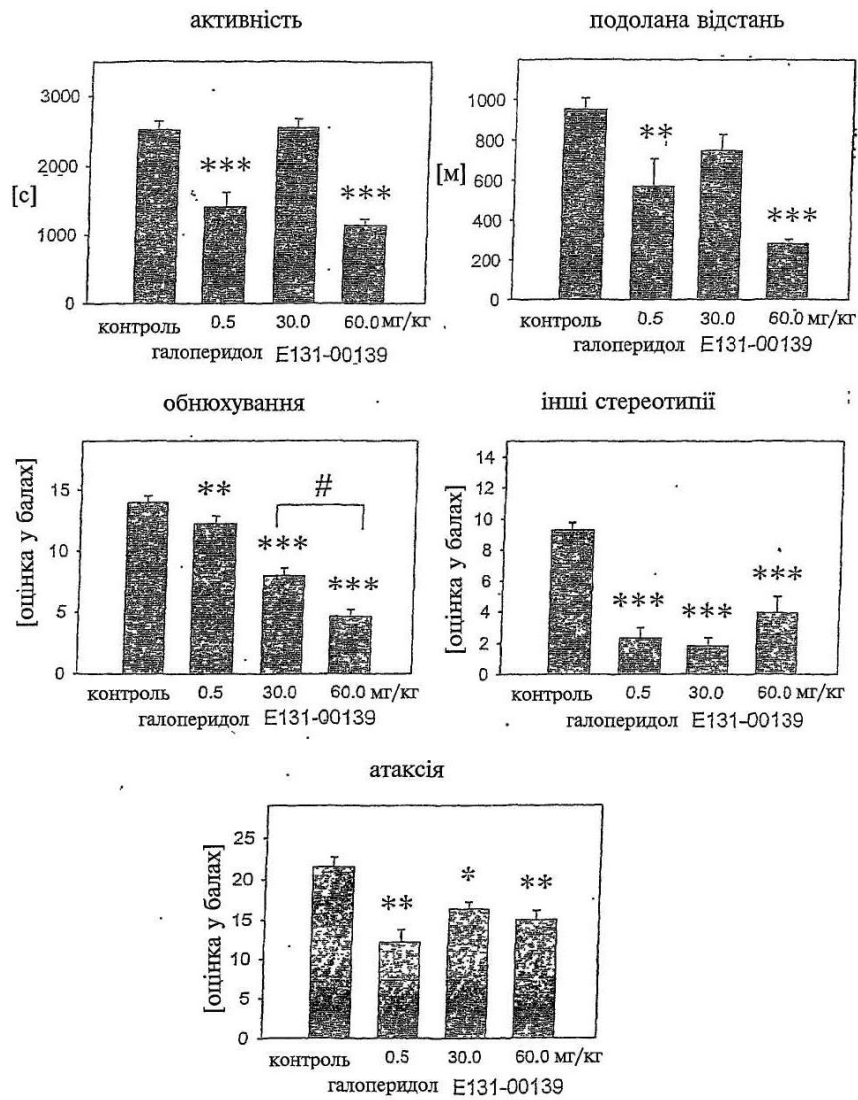
Vercueil L, Krack P., Pollak P. (2002). Results of deep brain stimulation for dystonia: a critical reappraisal. *Mov. Disord.* 17: S89-93.

Wither P. Animal models of depression: an overview. *Pharmacol. Ther.* 1990; 45: 425-455.

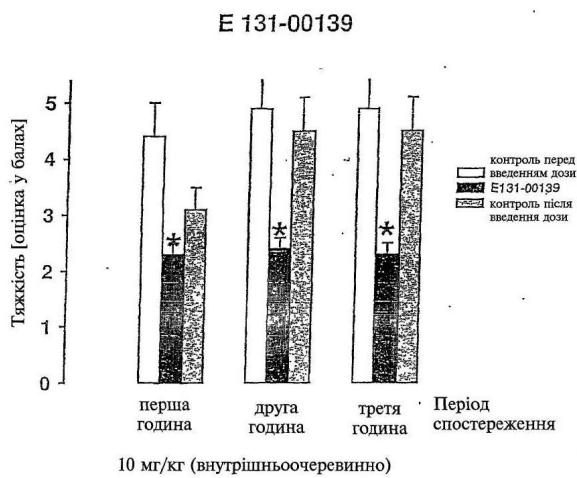
Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology* 1984; 83: 1-16.

Wisden W., Herb A., Wieland H., Keinänen K., Luddens H. and Seeburg P.H. (1991). Cloning, pharmacological characteristics and expression pattern of the rat GABAA receptor 04 subunit. *FEBS Lett.* 289, 227-230.

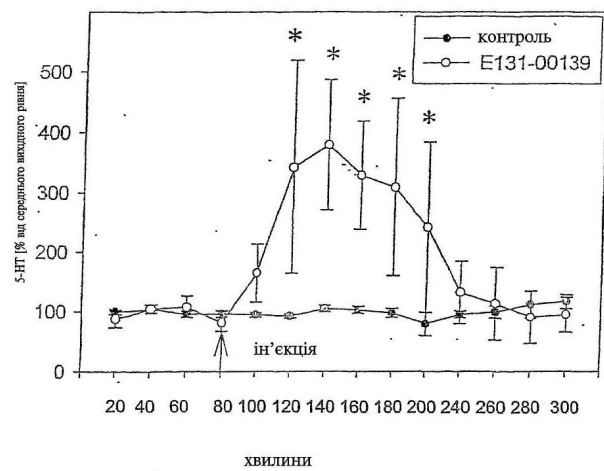
Ziprasidone (CP-88, 059): A new antipsychotic with combined dopamine and serotonin receptor antagonist activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275: 101-13.



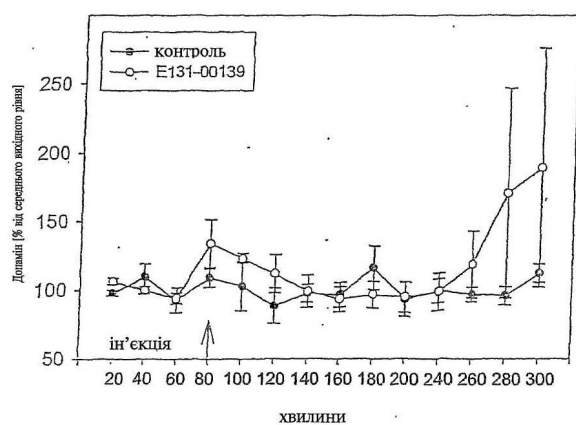
ФІГ. 1



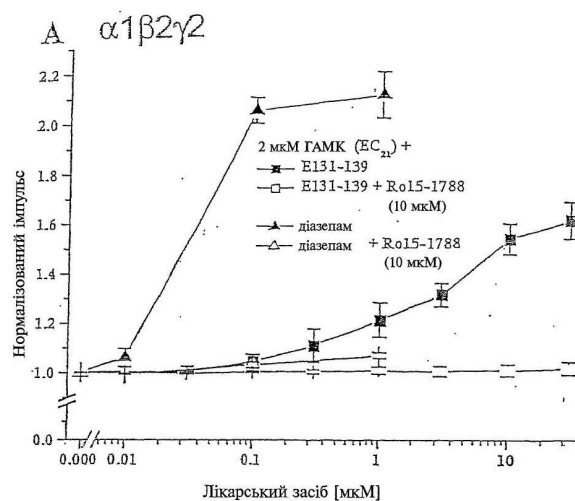
ФІГ. 2



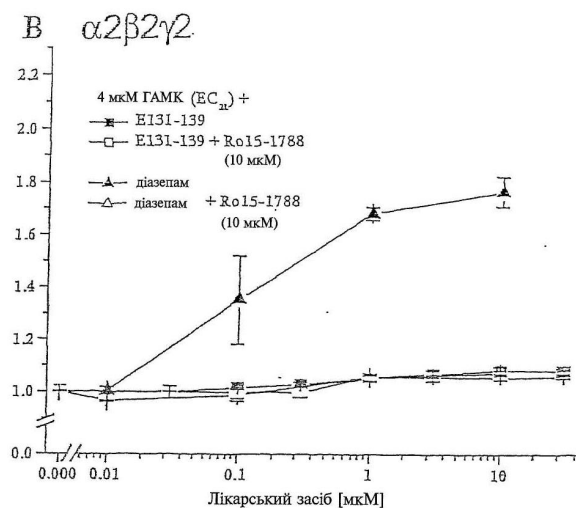
ФІГ. 3



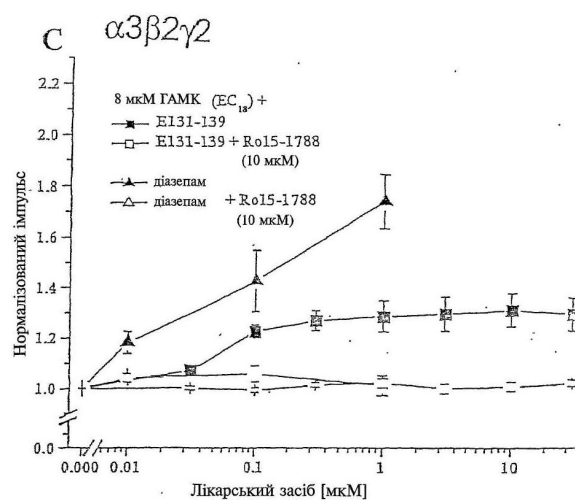
ФІГ. 4



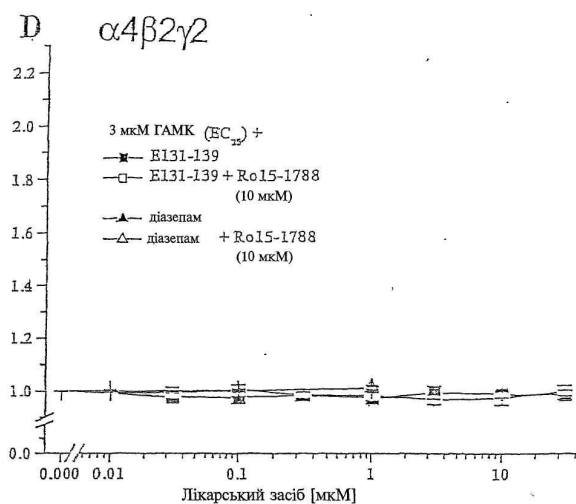
ФІГ. 5



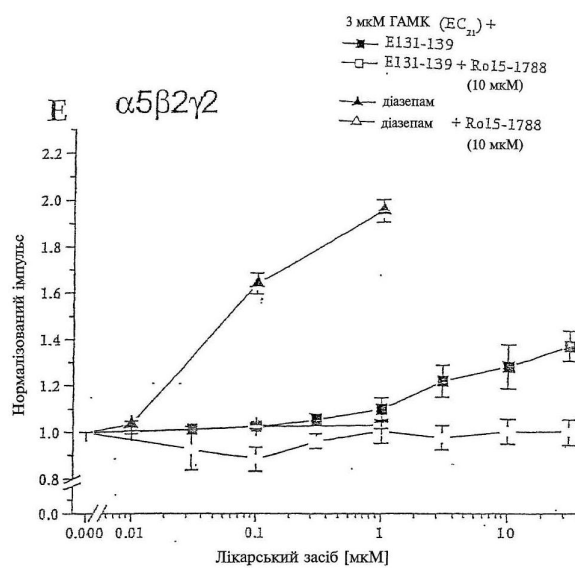
ФІГ. 5 продовження



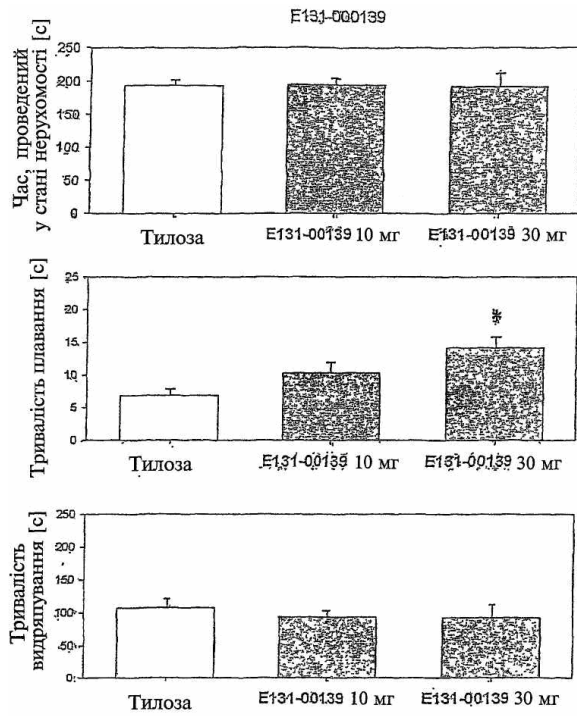
ФІГ. 5 продовження



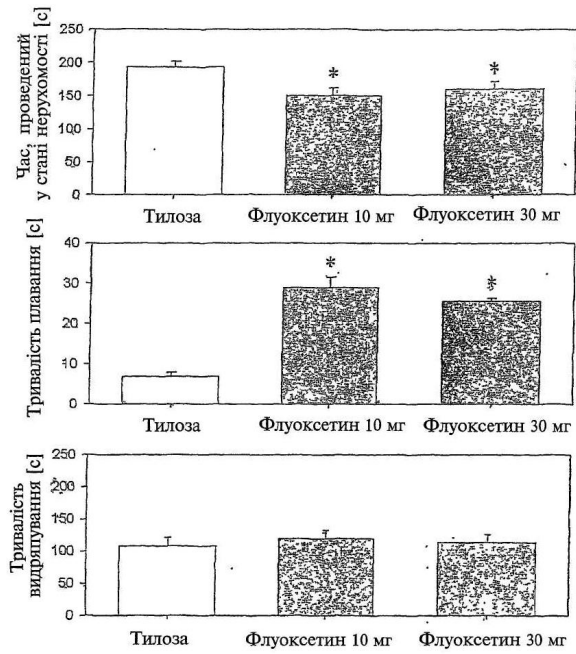
ФІГ. 5 продовження



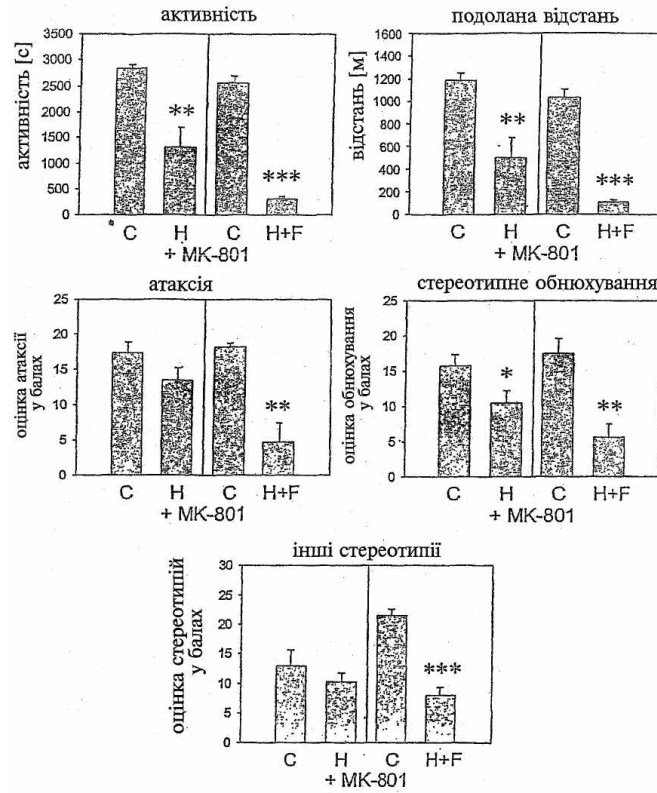
ФІГ. 5 продовження



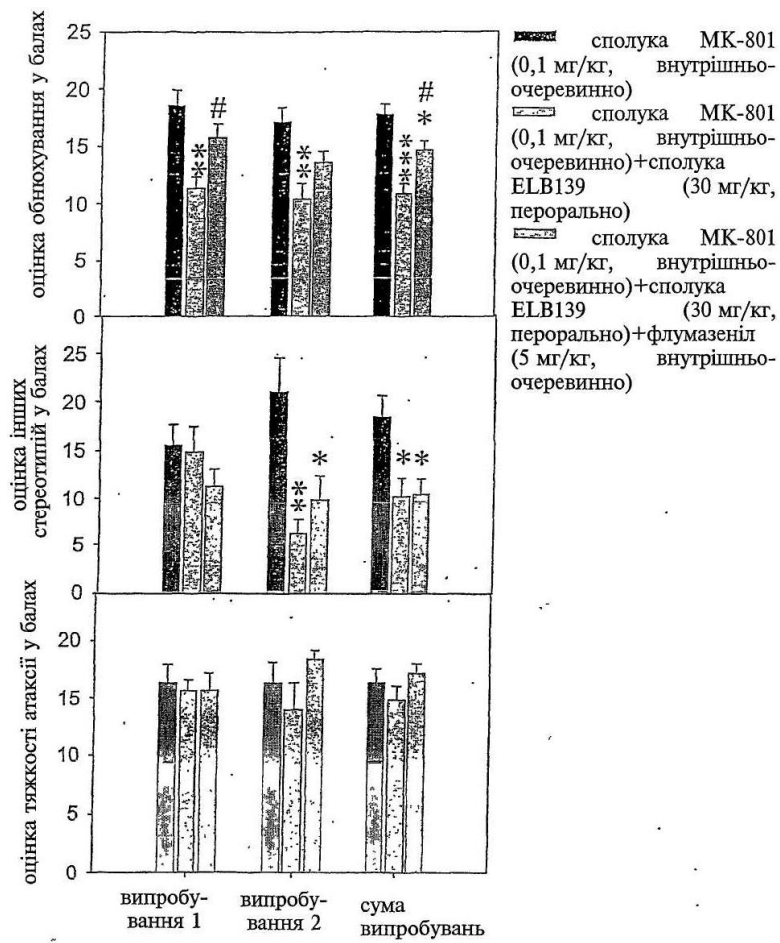
ФІГ. 6



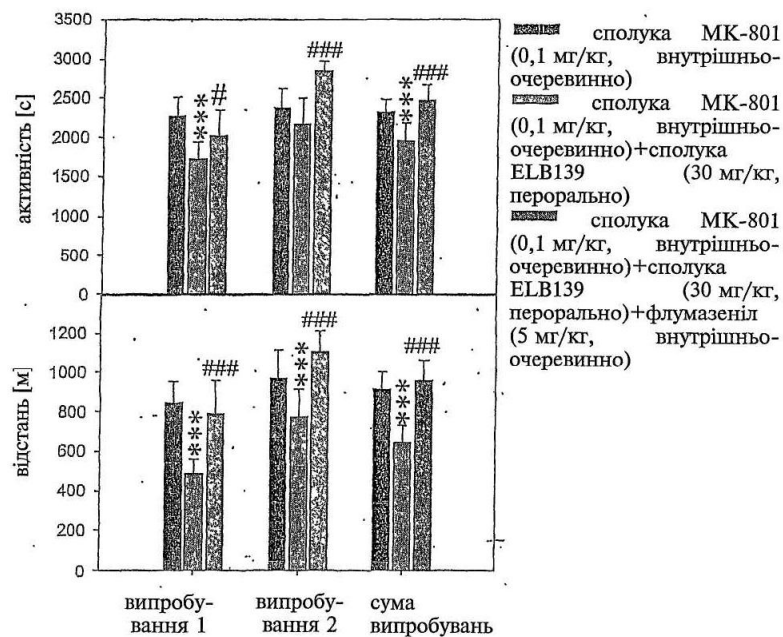
ФІГ. 7



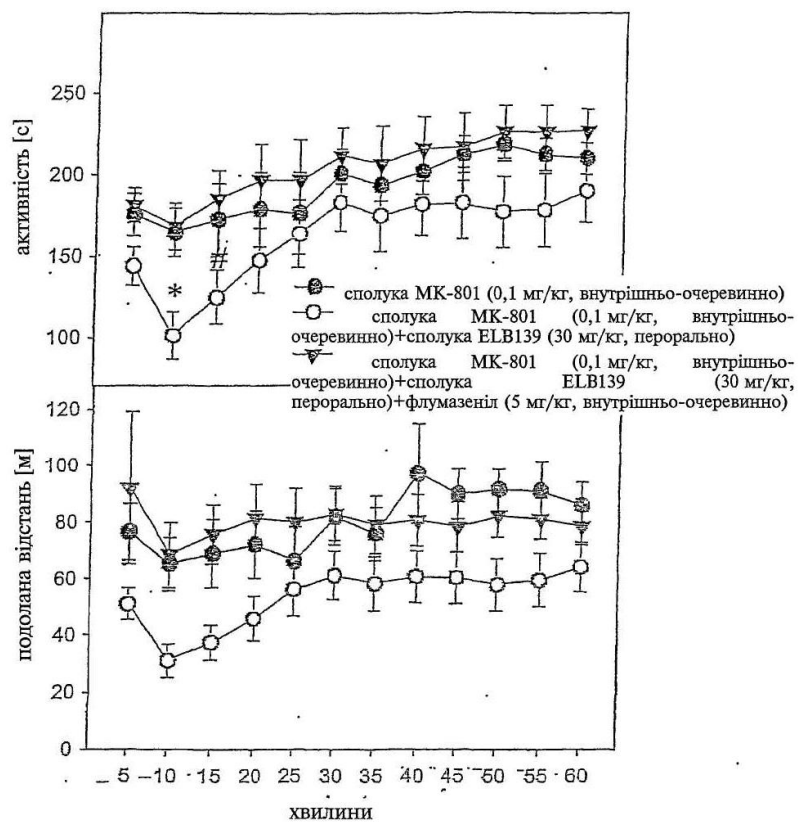
ФІГ. 8



ФІГ. 9



ФІГ. 10а



ФІГ. 10b