

**УКРАЇНА****(19) UA****(11) 99611****(13) C2****(51) МПК****A61K 31/451** (2006.01)**C07D 211/20** (2006.01)**A61P 25/24** (2006.01)**A61P 25/28** (2006.01)

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2009 10338	(72) Винахідник(и):	Стенсбьол Тіне Брайан (DK), Міллер Зілке (US)
(22) Дата подання заявки:	14.03.2008	(73) Власник(и):	Х. ЛУННБЕК А/С, Ottiliavej 9, DK-2500 Valby-Copenhagen, Denmark (DK)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.09.2012	(74) Представник:	Войтенко Олександр Петрович, реєстр. №23
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	РА 200700423, РСТ/DK2007/050076	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 03029232 A, 10.04.2003 WO 2006007843 A, 26.01.2006 WO 2007144006, 21.12.2007
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	20.03.2007, 15.06.2007		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	DK, DK		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.12.2009, Бюл.№ 23		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.09.2012, Бюл.№ 17		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/DK2008/050064, 14.03.2008		

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ДЕФІЦИТУ УВАГИ З ГІПЕРАКТИВНІСТЮ (ADHD) ТА ЗАСТОСУВАННЯ 4-[2-(4-МЕТИЛФЕНІЛСУЛЬФАНІЛ)ФЕНІЛ]ПІПЕРИДИНУ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ**(57) Реферат:**

Описується застосування 4-[2-(4-метилфенілсульфаніл)феніл]піперидину і його кислотно-адитивних солей для лікування дефіциту уваги з гіперактивністю (ADHD), ендогенної депресії, резистентної депресії або резидуальних симптомів депресії.

UA 99611 C2

Сполука 4-[2-(4-метилфенілсульфаніл)феніл]піперидин розкрита в міжнародній патентній заявці WO 03/029232. Наголошується, що дана сполука є інгібітором переносника серотоніну, має афінність до рецептора серотоніну 2C (5-HT_{2C}) і як така є корисною при лікуванні розладів настрою, таких як велика депресія і тривога.

Проте, як показано в наведених прикладах, даній сполуці притаманний більш широкий фармакологічний профіль, який визначає можливість застосування цієї сполуки при лікуванні також інших розладів, для лікування яких існує виражена потреба. Цей фармакологічний профіль розкритий також в WO 07/144006, де він описується у поєднанні з даними про застосування цієї сполуки при лікуванні інших захворювань.

Цей винахід в одному варіанті здійснення відноситься до способу лікування дефіциту уваги з гіперактивністю (ADHD), ендогенної депресії (меланхолії), резистентної (стійкої до лікування) депресії або резидуальних (залишкових) симптомів депресії, де вказаний спосіб включає введення пацієнтові, що потребує цього, терапевтично ефективної кількості 4-[2-(4-метилфенілсульфаніл)феніл]піперидину і його кислотно-адитивних солей (сполука I).

У одному варіанті здійснення цей винахід відноситься до застосування 4-[2-(4-метилфенілсульфаніл)феніл]піперидину і його кислотно-адитивних солей (сполука I) для виробництва лікарського засобу для лікування дефіциту уваги з гіперактивністю (ADHD), ендогенної депресії, резистентної депресії або резидуальних симптомів депресії.

У одному варіанті здійснення цей винахід відноситься до 4-[2-(4-метилфенілсульфаніл)феніл]піперидину і його кислотно-адитивних солей (сполука I) для застосування при лікуванні дефіциту уваги з гіперактивністю (ADHD), ендогенної депресії, резистентної депресії або резидуальних симптомів депресії.

Стислий опис ілюстративних матеріалів

Фіг. 1: Рентгенограма адитивної солі HBr сполуки I.

Фіг. 2: Рентгенограма сольвату адитивної солі HBr сполуки I.

Фіг. 3: Рентгенограма адитивної солі пальмітинової кислоти сполуки I.

Фіг. 4: Рентгенограма адитивної солі DL-молочної кислоти сполуки I.

Фіг. 5: Рентгенограма адитивної солі адипінової кислоти (1:1) сполуки I (α+β форма).

Фіг. 6: Рентгенограма адитивної солі адипінової кислоти (2:1) сполуки I.

Фіг. 7: Рентгенограма адитивної солі фумарової кислоти (1:1) сполуки I.

Фіг. 8: Рентгенограма адитивної солі глутарової кислоти (1:1) сполуки I.

Фіг. 9: Рентгенограма адитивної солі маленової кислоти (1:1) сполуки I, α-форма.

Фіг. 10: Рентгенограма адитивної солі маленової кислоти сполуки I, β-форма.

Фіг. 11: Рентгенограма адитивної солі щавлевої кислоти (1:1) сполуки I.

Фіг. 12: Рентгенограма адитивної солі себацінової кислоти (2:1) сполуки I.

Фіг. 13: Рентгенограма адитивної солі бурштинової кислоти (2:1) сполуки I.

Фіг. 14: Рентгенограма адитивної солі L-яблучної кислоти (1:1) сполуки I, α-форма.

Фіг. 15: Рентгенограма адитивної солі L-яблучної кислоти (1:1) сполуки I, β-форма.

Фіг. 16: Рентгенограма адитивної солі D-винної кислоти (1:1) сполуки I.

Фіг. 17: Рентгенограма адитивної солі L-аспарагінової кислоти (1:1) сполуки I в суміші з L-аспарагіновою кислотою.

Фіг. 18: Рентгенограма гідрату адитивної солі L-аспарагінової кислоти (1:1) сполуки I в суміші з L-аспарагіновою кислотою.

Фіг. 19: Рентгенограма адитивної солі глутамінової кислоти (1:1) сполуки I в суміші з моногідратом глутамінової кислоти.

Фіг. 20: Рентгенограма адитивної солі лимонної кислоти (2:1) сполуки I.

Фіг. 21: Рентгенограма кислотно-адитивної солі HCl сполуки I.

Фіг. 22: Рентгенограма адитивної солі фосфорної кислоти (1:1) сполуки I.

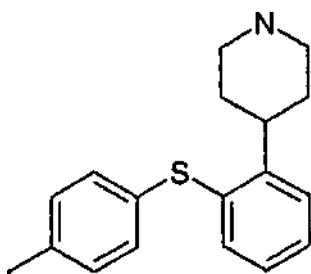
Фіг. 23: Рівні дофаміну в префронтальній корі головного мозку при введенні сполуки I.

Фіг. 24: Рівні ацетилхоліну в префронтальній корі головного мозку при введенні сполуки I.

Фіг. 25a+b: Рівні ацетилхоліну в префронтальній корі головного мозку і у вентральному гіпокампі при введенні сполуки I.

Фіг. 26: Вплив сполуки I на прояви дефіциту уваги і імпульсність поведінки у щурів I SHR.

Цей винахід відноситься до застосування сполуки I, яка являє собою 4-[2-(4-метилфенілсульфаніл)феніл]піперидин, і її фармацевтично прийнятних солей. Структура 4-[2-(4-метилсульфаніл)феніл]піперидину є наступною:



Фармакологічний профіль сполуки I представлений в прикладах, але може бути стисло описаний наступним чином. Сполука інгібує зворотне захоплення серотоніну і норепінефрину; вона інгібує рецептори серотоніну 2A, 2C і 3 і інгібує адренергічний рецептор α -1.

5 У одному варіанті вказаними кислотно-адитивними солями є солі кислот, які не є токсичними. Вказані солі включають солі, отримані з органічних кислот, таких як малеїнова, фумарова, бензойна, аскорбінова, бурштинова, щавлева, біс-метилен-саліцилова, метансульфонова, етандисульфонова, оцтова, пропіонова, винна, саліцилова, лимонна, глюконова, молочна, яблучна, маленова, мигдальна, корична, цитраконова, аспарагінова, стеаринова, пальмітинова, ітаконова, гліколева, пара-амінобензойна, глутамінова, бензолсульфонова, теофілін-оцтова кислоти, а також з 8-галогентеофілінів, наприклад, 8-бромтеофіліну. Вказані солі можуть бути також отримані з неорганічних кислот, таких як бромистоводнева, сірчана, сульфамінова, фосфорна і азотна кислоти.

У одному варіанті здійснення цього винаходу сполука I являє собою адитивну сіль HBr.

15 У одному варіанті здійснення цього винаходу сполука I являє собою адитивну сіль DL-молочної кислоти і, зокрема, 1:1 сіль.

У одному варіанті здійснення цього винаходу сполука I являє собою адитивну сіль L-аспарагінової кислоти і, зокрема, 1:1 сіль.

20 У одному варіанті здійснення цього винаходу сполука I являє собою адитивну сіль глутамінової кислоти і, зокрема, 1:1 сіль.

У одному варіанті здійснення цього винаходу сполука I являє собою адитивну сіль глутарової кислоти і, зокрема, 1:1 сіль.

25 У одному варіанті здійснення цього винаходу сполука I являє собою адитивну сіль маленової кислоти і, зокрема, 1:1 сіль, яка, як було виявлено, існує в двох поліморфних модифікаціях, α і β , де форма β вважається за найбільш стабільну, у зв'язку з її пониженою розчинністю.

У одному варіанті здійснення цього винаходу сполука I представлена в очищеній формі. Термін "очищена форма" в тексті цього опису використовується для позначення того, що сполука по суті не містить інших сполук або інших форм, наприклад, поліморфів вказаної сполуки, як один з прикладів.

30 Лікарські форми для перорального введення і, зокрема, пігулки і капсули, часто розглядаються пацієнтами і фахівцями медичного профілю як переважні для вживання у зв'язку з легкістю їх введення і, отже, легше досяжною згодою пацієнтів дотримуватися режиму лікування. У разі пігулок і капсул, переважно, щоб їх активні інгредієнти були кристалічними. У одному варіанті здійснення цього винаходу сполука I є кристалічною.

35 Кристали, використовувані згідно з цим винаходом, можуть існувати у вигляді сольватів, наприклад, це можуть бути кристали, в яких молекули розчинника утворюють частину кристалічної структури. Вказаний сольват може бути утворений з води, і в цьому випадку сольвати часто носять назву гідратів. Альтернативно, вказані сольвати можуть бути утворені з інших розчинників, таких як, наприклад, етанол, ацетон або етилацетат. Точна кількість сольвату часто визначається умовами. Так, наприклад, гідрати звичайно втрачають воду в міру підвищення температури або при зниженні відносної вологості. Сполуки, які не змінюються або змінюються лише в незначній мірі при зміні умов, наприклад, при зміні вологості, в основному розглядаються як більш відповідні для використання у фармацевтичних композиціях. Слід зазначити, що кислотно-адитивна сіль HBr не утворює гідрати при осадженні з води, тоді як інші сполуки, такі як адитивні солі бурштинової, яблучної і винної кислот, утворюють їх.

45 Деякі сполуки є гігроскопічними, тобто вони можуть абсорбувати воду при дії на них вологи. Гігроскопічність в основному розглядається як небажана властивість для сполук, які розглядають з точки зору їх включення до складу фармацевтичних композицій, зокрема, до складу сухих композицій, таких як пігулки або капсули. У одному варіанті здійснення цей винахід відноситься до кристалів з низькою гігроскопічністю.

50 У разі пероральних лікарських форм, що містять кристалічні активні інгредієнти, буде корисно, якщо такі кристали добре виражені. У контексті цього опису термін "добре виражені",

зокрема, означає, що добре визначена стехіометрія, а саме співвідношення між іонами, що формують сіль, визначається невеликими цілими числами, як 1:1, 1:2, 2:1, 1:1:1 і тому подібне. У одному варіанті здійснення сполуки цього винаходу є добре вираженими кристалами.

Розчинність активного інгредієнта є також важливою для вибору лікарської форми, оскільки вона може мати безпосередній вплив на біодоступність. Стосовно лікарських форм для перорального введення в основному вважається, що більш висока розчинність активного інгредієнта є корисною, оскільки при цьому підвищується біодоступність. Деякі пацієнти, зокрема немолоді пацієнти, можуть зазнавати труднощі при ковтанні пігулок, і, в зв'язку з цим, пероральні краплинні розчини можуть бути відповідною альтернативою, що дозволяє уникнути необхідності ковтати пігулки. Для обмеження об'єму перорального краплинного розчину необхідно, щоб розчин мав високу концентрацію активного інгредієнта, що знов-таки потребує високої розчинності даної сполуки. Як показано в таблиці 3, адитивні солі DL-молочної кислоти, L-аспарагінової кислоти, глутамінової кислоти, глутарової кислоти і маленової кислоти мають виключно високу розчинність.

Кристалічні форми впливають на здатність сполуки до фільтрування і до переробки. Голчасті кристали важче піддаються обробці в процесі виробництва, за рахунок того, що в цьому випадку стадія фільтрування ускладнюється і стає витратною за часом. Точна кристалічна форма кожної конкретної солі може залежати, наприклад, від умов, в яких дана сіль була осаджена. Так, кислотно-адитивна сіль HBr сполуки I утворює сольватовані кристали голчастої форми при осадженні з етанолу, оцтової кислоти і пропанолу, проте, у тому випадку, коли вказану кислотно-адитивну сіль HBr осаджують з води, утворюються негідратовані кристали, які не мають голчастої форми, але які забезпечують досягнення прекрасної здатності отриманої сполуки до фільтрування.

У таблиці 3 також показані кінцеві значення pH, тобто значення pH в насиченому розчині солі. Ця властивість враховується у зв'язку з її важливістю, оскільки при зберіганні ніколи не вдається повністю уникнути вологи, а накопичення вологи приводить до зниження pH усередині або на поверхні пігулки, що містить сіль з низьким кінцевим значенням pH солі, що, у свою чергу, може знизити термін придатності. Крім того, сіль з низьким кінцевим значенням pH може сприяти процесу корозії устаткування в процесі виробництва, якщо пігулки отримують вологою грануляцією. Наведені в таблиці 3 дані указують на те, що адитивні солі HBr, HCl і адипінової кислоти можуть бути найкращими в даному аспекті.

У одному варіанті здійснення сполука I є адитивною сіллю HBr в кристалічній формі, особливо в очищеній формі. У іншому варіанті здійснення вказана сіль HBr має піки на порошковій рентгенограмі (XRPD) при приблизно 6,08°, 14,81°, 19,26° і 25,38° 2θ, і, зокрема, вказана сіль HBr характеризується порошковою рентгенограмою (XRPD), наведеною на фіг. 1.

У одному варіанті здійснення сполука I є адитивною сіллю DL-молочної кислоти (1:1) в кристалічній формі, зокрема, в очищеній формі. У іншому варіанті здійснення вказана адитивна сіль DL-молочної кислоти має піки на порошковій рентгенограмі (XRPD) при приблизно 5,30°, 8,81°, 9,44° і 17,24° 2θ, і, зокрема, вказана адитивна сіль DL-молочної кислоти характеризується порошковою рентгенограмою (XRPD), наведеною на фіг. 4.

У одному варіанті здійснення сполука I є адитивною сіллю L-аспарагінової кислоти (1:1) в кристалічній формі, зокрема, в очищеній формі. У іншому варіанті здійснення вказана адитивна сіль L-аспарагінової кислоти є несольватованою і має піки на порошковій рентгенограмі (XRPD) при приблизно 11,05°, 20,16°, 20,60° і 25,00° 2θ, і, зокрема, вказана сіль L-аспарагінової кислоти, коли вона змішана з L-аспарагіновою кислотою, характеризується порошковою рентгенограмою (XRPD), наведеною на фіг. 17. У одному варіанті здійснення вказана адитивна сіль L-аспарагінової кислоти є гідратом, зокрема, в очищеній формі. У іншому варіанті здійснення вказаний гідрат адитивної солі L-аспарагінової кислоти має піки на XRPD при приблизно 7,80°, 13,80°, 14,10°, 19,63° 2θ, і, зокрема, вказаний гідрат адитивної солі L-аспарагінової кислоти, коли він змішаний з L-аспарагіновою кислотою, характеризується порошковою рентгенограмою (XRPD), наведеною на фіг. 18.

У одному варіанті здійснення сполука I є адитивною сіллю глутамінової кислоти (1:1) в кристалічній формі, зокрема, в очищеній формі. У іншому варіанті здійснення вказана адитивна сіль глутамінової кислоти має піки на XRPD при приблизно 7,71°, 14,01°, 19,26° і 22,57° 2θ, і, зокрема, вказана сіль глутамінової кислоти, коли вона змішана з моногідратом глутамінової кислоти, характеризується порошковою рентгенограмою (XRPD), наведеною на фіг. 19.

У одному варіанті здійснення сполука I є адитивною сіллю маленової кислоти (1:1) в кристалічній формі, зокрема, в очищеній формі. У іншому варіанті здійснення вказана адитивна сіль маленової кислоти знаходиться в α-формі і має піки на XRPD при приблизно 10,77°, 16,70°, 19,93° і 24,01° 2θ, або вказана адитивна сіль маленової кислоти знаходиться в β-формі і має

піки на XRPD при приблизно 6,08°, 10,11°, 18,25° і 20,26° 2θ, і, зокрема, вказана адитивна сіль малонової кислоти характеризується порошковою рентгенограмою (XRPD), наведеною на фіг. 9 або фіг. 10.

У одному варіанті здійснення сполука I є адитивною сіллю глутарової кислоти (1:1) в кристалічній формі, зокрема, в очищеній формі. У іншому варіанті здійснення вказана адитивна сіль глутарової кислоти має піки на XRPD при приблизно 9,39°, 11,70°, 14,05° і 14,58° 2θ, і, зокрема, вказана адитивна сіль глутарової кислоти характеризується порошковою рентгенограмою (XRPD), наведеною на фіг. 8.

Унікальний фармакологічний профіль сполуки I робить її придатною для лікування захворювань, додаткових до вказаних у WO 03/029232. Рецептори 5-HT_{2C} локалізовані, наприклад, на дофамінергічних нейронах, активація яких приводить до тонічної інгібуючої дії на вивільнення дофаміну, тоді як антагоністи 5-HT_{2C} впливатимуть у напрямку підвищення рівня дофаміну. Дані, представлені в Прикладі 2E, показують, що сполука I, фактично, призводить до доза-залежного підвищення позаклітинних рівнів дофаміну в префронтальній корі головного мозку. На підставі цього положення можна висловити гіпотезу, згідно якої антагоністи 5-HT_{2C} особливо добре підходять для лікування депресії, невідчужливої до лікування селективними інгібіторами зворотного захоплення серотоніну [Psychopharmacol. Bull., 39, 147-166, 2006]. Ця гіпотеза знаходить підтримку у вигляді результатів декількох клінічних випробувань, які демонструють, що комбінація міртазіпіну і SSRI перевершує за досягнутим ефектом введення SSRI самого по собі при лікуванні депресії у пацієнтів з неадекватною клінічною реакцією (стійка до лікування депресія, TRD, або резистентна депресія) [Psychother. Psychosom., 75, 139-153, 2006]. Міртазапін є також антагоністом 5-HT₂ і 5-HT₃, і це вказує на те, що сполуки, що здійснюють інгібування зворотного захоплення серотоніну в поєднанні з антагонізмом до 5-HT₂ і 5-HT₃, такі як сполука I, корисні для лікування TRD, тобто вони будуть підвищувати швидкість ремісії у пацієнтів, що мають стійку до лікування депресію.

Дані, представлені в Прикладах 2F і 2G, показують, що сполука I практично здійснює підвищення позаклітинного рівня ацетилхоліну в префронтальній корі головного мозку і у вентральному гіпокампі. Є давно відоме клінічне підтвердження того, що підвищення рівнів ацетилхоліну в головному мозку є шляхом лікування хвороби Альцгеймера і когнітивних порушень в цілому, як, наприклад, за допомогою використання інгібіторів ацетилхолін-естерази при лікуванні хвороби Альцгеймера. На підставі цього вважають, що сполуки цього винаходу будуть корисними при лікуванні хвороби Альцгеймера і когнітивних порушень, а також розладів настрою, таких як депресія, що пов'язана з хворобою Альцгеймера і когнітивними порушеннями.

Частина пацієнтів з депресією реагуватимуть на лікування антидепресантами, такими як, наприклад, SSRI, в тому сенсі, що їх стан буде покращуватися згідно зі шкалами, що відповідають клінічній депресії, такими як MADRD і HAMD, але при цьому інші симптоми, такі як порушення сну і когнітивні порушення, залишатимуться. У цьому контексті даних пацієнтів називають частково реагуючими. В результаті обговорюваної вище дії на рівні ацетилхоліну очікується, що сполуки цього винаходу будуть корисними при лікуванні когнітивних порушень на додаток до депресії. Клінічні дослідження показали, що сполука празосин, яка є антагоністом адренергічного рецептора α-1, зменшує порушення сну [Biol. Psychiatry, 61, 928-934, 2007]. Більш того, також вважається, що антагонізм стосовно 5-HT_{2A} і 5-HT_{2C} сполук цього винаходу має седативну поліпшуючу сон дію [Neuropharmacol., 33, 467-471, 1994], в зв'язку з цим, сполука I є корисною для лікування частково реагуючих пацієнтів або, іншими словами, лікування пацієнтів з депресією сполукою I буде зменшувати частину частково реагуючих пацієнтів.

Дефіцит уваги з гіперактивністю (ADHD) належить до найбільш поширених нервових розладів з біхевіоральним компонентом. ADHD визначається тріадою соціальних і комунікативних порушень з наявністю обмеженого повторюваного або стереотипного характеру поведінки. Зазвичай ADHD починається в дитинстві або підлітковому віці, хоча його симптоми можуть залишатися і пізніше, виявляючись в дорослому стані. Атомоксетин є в даний час єдиним препаратом не стимулюючого типу, дозволеним Управлінням США по контролю за лікарськими препаратами і харчовими продуктами (FDA), для лікування ADHD [Drugs, 64, 205-222, 2004]. Атомоксетин є інгібітором зворотного захоплення норепінефрину, який також сприяє підвищенню рівня дофаміну в префронтальній корі головного мозку. Було висловлено припущення, що підвищення рівня вказаних нейротрансмітерів опосередковує терапевтичний ефект атомоксетину при лікуванні ADHD [Eur. Neuropsychopharmacol., 12, suppl. 3, 418, 2002]. Дане положення підтримує ідею про можливість застосування сполуки I при лікуванні ADHD. Крім того, сполуки цього винаходу можуть надавати седативний ефект за рахунок описаного вище антагонізму у відношенні адренергічного рецептора α-1 і 5-HT₂, який є сприятливим для лікування ADHD. Як показано в Прикладі 3, результати досліджень, проведених на щурах,

показують, що сполука I знижує гіперактивність, імпульсивність і дефіцит уваги.

Ендогенна депресія є конкретним підтипом депресії, яка часто пов'язана з важкою депресією; даний тип депресії часто позначається як меланхолійна депресія. Ендогенна депресія пов'язана з тривогою, страхом перед майбутнім, безсонням і втратою апетиту. Було показано, що сполуки, які інгібують зворотне захоплення як серотоніну, так і норепінефрину, такі як, наприклад, венлафаксин, особливо ефективні при лікуванні пацієнтів з важкою депресією і ендогенною депресією [Depres. Anxiety, 12, 50-54, 2000]. Як обговорювалося вище, сполуки, що демонструють антагонізм відносно 5-HT_{2C}, підвищують рівень дофаміну, так що, як очікується, такі сполуки будуть ефективними при лікуванні ендогенної депресії [Psychopharm. Bull., 39, 147-166, 2006]. Крім того, антагонізм у відношенні адренергічного рецептора α -1 і 5-HT₂ сполук цього винаходу буде, як очікується, сприяти нормалізації сну, оскільки вказані сполуки корисні для лікування ендогенної депресії.

Цей винахід в одному варіанті здійснення відноситься до способу лікування ADHD, ендогенної депресії, резистентної депресії або резидуальних симптомів депресії, при цьому вказаний спосіб включає введення пацієнтові, що потребує цього, терапевтично ефективної кількості 4-[2-(4-метилфенілсульфаніл)феніл]піперидину і його кислотно-адитивних солей (сполука I). У одному варіанті здійснення цього винаходу вказаний пацієнт, який підлягає лікуванню відповідно до будь-якого з перелічених вище захворювань, раніше вже був продіагностований як такий, що має вказане захворювання.

У одному варіанті здійснення сполуки цього винаходу вводять в кількості від приблизно 0,001 до приблизно 100 мг/кг маси тіла в день.

Типове дозування при пероральному введенні знаходиться в діапазоні від приблизно 0,001 до приблизно 100 мг/кг маси тіла на день, переважно, від приблизно 0,01 до приблизно 50 мг/кг маси тіла на день при введенні однієї або декількох доз, наприклад, 1-3 доз. Точне дозування визначатиметься частотою і способом введення, статтю, віком, масою і загальним станом здоров'я суб'єкта, якого піддають лікуванню, природи і тяжкості стану, що лікують, наявності будь-яких супутніх захворювань, що також підлягають лікуванню, та інших чинників, відомих фахівцям в даній галузі.

Типове дозування при пероральному введенні для дорослих складає 1-100 мг/день сполуки цього винаходу, наприклад, 1-30 мг/день, 5-25 мг/день або 5-60 мг/день. У типовому випадку таке дозування може бути досягнуте при введенні 0,1-60 мг, наприклад, 0,1-50 мг, 1-25 мг, 1-35 мг, і, зокрема, таких доз, як 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 або 60 мг сполуки I один раз або двічі на день.

У цьому описі термін "терапевтично ефективна кількість" сполуки означає кількість, достатню для лікування, ослаблення або часткового припинення клінічних проявів даного захворювання і його ускладнень в результаті терапевтичної інтервенції, що включає введення вказаної сполуки. Кількість, адекватна для досягнення цієї мети, визначається як "терапевтично ефективна кількість". Даний термін також охоплює такі кількості, які є достатніми для лікування, ослаблення або часткового припинення клінічних проявів вказаного захворювання і його ускладнень в ході лікування, що включає введення вказаної сполуки. Ефективні кількості, адекватні для досягнення кожної з таких цілей, залежатимуть від тяжкості захворювання або пошкодження, а також від маси і загального стану здоров'я суб'єкта. Зрозуміло, що визначення відповідних дозувань може проводитися в рамках рутинних експериментів шляхом побудови матриці значень і тестування різних точок цієї матриці, що може без зусиль зробити звичайний навчений лікар.

Термін "лікування" і використовувані в цьому описі всі його похідні форми означають комплекс заходів, направлених на ведення пацієнта і догляд за ним з метою боротьби з таким станом, який визначається захворюванням або розладом. Даний термін, в контексті його застосування, охоплює повний спектр лікування, що проводиться для конкретного стану, від якого страждає пацієнт, наприклад, введення активної сполуки з метою ослаблення прояву симптомів або ускладнень, затримки розвитку захворювання, розладу або патологічного стану, ослаблення або полегшення симптомів або ускладнень і/або для лікування або повного усунення захворювання, розладу або патологічного стану, а також для профілактики вказаного патологічного стану, де вказану профілактику слід розуміти як систему ведення і догляду за пацієнтом з метою боротьби із захворюванням, патологічним станом або розладом, і де вказана профілактика включає введення активних сполук для попередження початку появи симптомів або ускладнень. При цьому профілактичний (превентивний) і терапевтичний (лікувальний) підходи в лікуванні є двома окремими аспектами цього винаходу. Пацієнт, що підлягає лікуванню, є переважно ссавцем, зокрема людиною.

Цей винахід в одному варіанті здійснення відноситься до застосування 4-[2-(4-

метилфенілсульфаніл)феніл]піперидину і його кислотно-адитивних солей (сполука I) для виробництва лікарського засобу для лікування ADHD, ендогенної депресії, резистентної депресії або резидуальних симптомів депресії.

Цей винахід в одному варіанті здійснення відноситься до 4-[2-(4-метилфенілсульфаніл)феніл]піперидину і його кислотно-адитивних солей (сполука I) для використання при лікуванні ADHD, ендогенної депресії, резистентної депресії або резидуальних симптомів депресії.

Сполуки цього винаходу можуть вводитися самі по собі у вигляді чистої сполуки або у поєднанні з фармацевтично прийнятними носіями або ексципієнтами, у вигляді одиничної дози або множинних доз. Фармацевтичні композиції цього винаходу можуть бути виготовлені з використанням фармацевтично прийнятних носіїв або розріджувачів, а також будь-яких інших відомих ад'ювантів і ексципієнтів, відповідно до традиційних процедур, таких як ті, що описані в керівництві Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19 Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co, Easton, PA, 1995.

Фармацевтичні композиції можна спеціально приготувати для введення будь-яким відповідним способом, таким як пероральний, ректальний, назальний, пульмональний, місцевий (включаючи букальний і під'язиковий), трансдермальний, інтрацистернальний, внутрішньочеревинний, вагінальний і парентеральний (включаючи підшкірний, внутрішньом'язовий, інтратекальний, внутрішньовенний і внутрішньошкірний) спосіб, при цьому пероральний спосіб є переважним. Слід враховувати, що переважний спосіб залежатиме від загального стану здоров'я і віку суб'єкта, якого треба лікувати, природи стану, який треба лікувати, і вибраного активного інгредієнта.

Фармацевтичні композиції для перорального введення включають тверді лікарські форми, такі як капсули, пігулки, драже, пілюлі, пастили, порошки і гранули. Коли це доцільно, їх можна одержувати з покриттями.

Рідкі лікарські форми для перорального введення включають розчини, емульсії, суспензії, сиропи і еліксири.

Фармацевтичні композиції для парентерального введення включають стерильні водні і неводні відповідні розчини, дисперсії, суспензії або емульсії для ін'єкцій, так само як і стерильні порошки для розведення в стерильних розчинах або дисперсіях для ін'єкції перед використанням.

Інші відповідні для введення форми включають супозиторії, спреї, мазі, креми, гелі, засоби для інгаляції, шкірні пластири, імплантати тощо.

Зручно вводити сполуки за винаходом в одиничній лікарській формі, що містить вказані сполуки в кількості приблизно від 0,1 до 50 мг, наприклад, 1 мг, 5 мг, 10 мг, 15 мг, 20 мг, 25 мг, 30 або 35 мг сполуки I.

Для парентеральних способів введення, таких як внутрішньовенне, інтратекальне, внутрішньом'язове і подібне введення, як правило, дози складають порядку приблизно половини дози, вживаної для перорального введення.

Для парентерального введення можна застосовувати розчини сполуки за винаходом в стерильному водному розчині, водному пропіленгліколі, водному вітаміні Е або кунжутній або арахісовій олії. Такі водні розчини треба відповідним чином забуферити, якщо це необхідно, і спочатку зробити рідкий розчинник ізотонічним за допомогою достатньої кількості сольового розчину або глюкози. Водні розчини є, зокрема, придатними для внутрішньовенного, внутрішньом'язового, підшкірного і внутрішньочеревинного введення. Всі вживані стерильні водні середовища легко одержати за загальноприйнятими способами, відовими фахівцям в даній галузі.

Придатні фармацевтичні носії включають інертні тверді розріджувачі або наповнювачі, стерильний водний розчин і різні органічні розчинники. Прикладами твердих носіїв є лактоза, каолін, сахароза, циклодекстрин, тальк, желатин, агар, пектин, гуміарабік, стеарат магнію, стеаринова кислота і нижчі алкілові етери целюлози. Прикладами рідких носіїв є сироп, арахісова олія, оливкова олія, фосфоліпіди, жирні кислоти, аміни жирних кислот, поліоксіетилен і вода. Фармацевтичні композиції, одержані об'єднанням сполуки за винаходом і фармацевтично прийнятних носіїв, потім легко вводяться в різноманітних лікарських формах, відповідних до описаних способів введення.

Склади за цим винаходом, придатні для перорального введення, можуть бути виготовлені у вигляді окремих одиниць, таких як капсули або пігулки, кожна з яких містить заздалегідь зумовлену кількість активного інгредієнта, і які можуть включати підхожий ексципієнт. Крім того, придатні для перорального введенняклади можуть бути у формі порошку або гранул, розчину або суспензії у водній або неводній рідині, або у формі рідкої емульсії типу "олія у воді" або

"вода в олії".

Якщо твердий носій використовують для перорального введення, препарат може бути пігулкою, наприклад, у формі порошку або гранул, поміщених в тверду желатинову капсулу, або у формі пастилки або пігулки для розсмоктування. Кількість твердого носія може мінятися, але зазвичай вона становить від приблизно 25 мг до приблизно 1 г.

Якщо використовують рідкий носій, препарат може бути у формі сиропу, емульсії, м'якої желатинової капсули або стерильної придатної для ін'єкції рідини, такої як водна або неводна рідка суспензія або розчин.

Пігулки можна одержувати змішуванням активного інгредієнта із звичайними ад'ювантами і/або розріджувачами з подальшим пресуванням суміші в звичайній таблетувальній машині. Приклади ад'ювантів або розріджувачів включають: кукурудзяний крохмаль, картопляний крохмаль, тальк, стеарат магнію, желатин, лактозу, камедь тощо. Будь-які інші ад'юванти або добавки, зазвичай вживані для таких цілей, такі як барвники, ароматизатори, консерванти тощо, можна використовувати, за умови, що вони є сумісними з активними інгредієнтами.

Капсули, що містять сполуку за цим винаходом, можна одержати перемішуванням порошку, який містить вказану сполуку з мікрокристалічною целюлозою і стеаратом магнію, і поміщенням вказаного порошку в тверду желатинову капсулу. Необов'язково, вказану капсулу можна забарвлювати за допомогою відповідного пігменту. Як правило, капсули міститимуть 0,25-20 % сполуки за цим винаходом, наприклад, 0,5-1,0 %, 3,0-4,0 %, 14,0-16,0 % сполуки за цим винаходом. Ці концентрації можна використовувати для зручної доставки 1, 5, 10, 15, 20 і 25 мг сполуки за цим винаходом в одиничній дозованій формі.

Розчини для ін'єкцій можна одержати розчиненням активного інгредієнта і можливих добавок в частині розчинника для ін'єкції, переважно стерильній воді, доведенням розчину до бажаного об'єму, стерилізацією цього розчину і наповненням ним відповідних ампул або флаконів. Можна додавати будь-які відповідні добавки, загальноприйняті в даній галузі, такі як агенти ізотонічності, консерванти, антиоксиданти тощо.

Сполука I може вводитися або сама по собі, або у комбінації з іншою терапевтично активною сполукою, при цьому дві такі сполуки можуть вводитися або одночасно, або послідовно. Приклади терапевтично активних сполук, які можуть бути з перевагою об'єднані із сполукою I, включають седативні або снодійні засоби, такі як бензодіазепіни; протисудомні препарати, такі як ламотригін, вальпроєва кислота, топірамат, габапентин, карбамазепін; засоби для корекції настрою, такі як препарати літію; дофамінергічні лікарські засоби, такі як агоністи дофаміну і ліводопа; лікарські засоби, вживані для лікування ADHD, такі як атомоксетин; психостимулятори, такі як модафініл, кетамін, метилфенідат і амфетамін; інші антидепресанти, такі як міртазапін, міансерин і бупропріон; гормони, такі як ТЗ, естроген, дегідроізоандростерон і тестостерон; атипичні антипсихотичні засоби, такі як оланзапін і арипіпразол; типові антипсихотичні засоби, такі як галоперидол; лікарські засоби для лікування хвороби Альцгеймера, такі як інгібітори холін-естерази і мемантин, фолат; S-аденозилметіонін; імунomodulatory, такі як інтерферони; опіати, такі як бупренорфіни; антагоністи рецептора 1 ангіотензину II (антагоністи AT1); інгібітори АХЕ; статини і антагоніст альфа1-адренергічного рецептора, такий як празозин.

Сполуку I можна одержувати за процедурою, описаною у WO 2003/029232 або у WO 2007/144006. Для утворення різних солей передбачається додавання відповідної кислоти до вільної основи з подальшим осадженням. Осадження можна викликати, наприклад, охолодженням, видаленням розчинника, додаванням іншого розчинника або їх суміші.

Всі посилання, включаючи публікації, патентні заявки і патенти, процитовані в цьому описі, включені в цей опис шляхом посилання в повному їх обсязі і в тому ступені, мовби для кожного посилання було вказано окремо і конкретно, що воно включено шляхом посилання і наведено в його повному обсязі в цьому описі (до максимального ступеня, що допускається законом), незалежно від будь-якого окремо наданого включення конкретних документів, зробленого будь-де в цьому описі винаходу.

Застосування форм однини і схожих об'єктів посилання в контексті опису винаходу слід тлумачити як такі, що охоплюють як єдине, так і множинне число, якщо в цьому описі нема інших вказівок або якщо контекст явно не суперечить цьому. Наприклад, вираз "сполука" слід розуміти як вказівку на різноманітні сполуки цього винаходу або на конкретний описаний аспект, якщо нема інших вказівок.

Якщо нема інших вказівок, всі точні значення, представлені в цьому описі, є репрезентативними для відповідних приблизних значень (наприклад, можна вважати, що всі приклади точних значень, представлені відносно конкретного чинника або вимірювання, також відносяться до відповідного приблизного значення, модифікованого за допомогою слова

"приблизно", коли це доцільно).

Опис будь-якого аспекту або аспекту винаходу з використанням таких термінів, як "що містить", "що має", "що включає" або "що охоплює" по відношенню до елементу або елементів, призначений для надання основи для схожого аспекту або аспекту цього винаходу, який "складається з", "по суті складається з", цього конкретного елементу або елементів або "по суті містить" їх, якщо нема інших вказівок або якщо контекст явно не суперечить цьому (наприклад, композицію, описану в цьому описі винаходу, як таку, що містить конкретний елемент, слід також розуміти як опис композиції, що складається з цього елементу, якщо нема інших вказівок або якщо контекст явно не суперечить цьому).

Приклади

Аналітичні методи

Порошкові рентгенограми (XRPD) вимірюють на дифрактометрі PANalytical X'Pert PRO X-Ray з використанням радіоактивного випромінювання $\text{CuK}_{\alpha 1}$. Зразки вимірювали в режимі відбиття в 2 θ -діапазоні 5-40° з використанням пристрою для детекції X'celerator.

Елементний склад (CHN) вимірювали на апараті Elementar Vario EL від Elementar. Приблизно 4 мг зразка використовували для кожного вимірювання, і результати дані як середні значення двох вимірювань.

Приклад 1a. Сіль HBr сполуки I

До 442 г етилового естеру 4-(2-п-толілсульфанілфеніл)піперидин-1-карбонової кислоти у вигляді оливи, що перемішували і слабо нагрівали (приблизно 45 °C), додавали 545 мл 33 % мас. HBr в AcOH (5,7 М, 2,5 екв.). Це перемішування давало екзотермічний ефект у 10 °C. Після закінчення додавання реакційну суміш нагрівали до 80 °C і залишали на 18 годин. Відбирали зразок і аналізували за допомогою ВЕРХ і, якщо не відбувалося завершення реакції, було необхідним додавати іще 33 % мас. HBr в AcOH. У іншому випадку суміш охолоджували до 25 °C, примушуючи осідати продукт, гідробромід 4-(2-п-толілсульфанілфеніл)піперидину. Через одну годину при 25 °C до густої суспензії додали 800 мл діетилового етеру. Перемішування продовжували ще годину перед тим, як продукт виділяли фільтрацією, промивали 400 мл діетилового етеру і висушували під вакуумом при 40 °C протягом ночі. Гідробромід сполуки I виділяли у вигляді білої твердої речовини.

Приклад 1b. HBr сіль сполуки I

2-(4-Толілсульфаніл)фенілбромід

У реакторі при перемішуванні в атмосфері азоту продували азотом N-метил-піролідон (NMP) (4,5 л) протягом 20 хвилин. Додавали 4-метилбензолтіол (900 г, 7,25 моль) і потім 1,2-дибромбензол (1709 г, 7,25 моль). Нарешті додавали трет-бутоксид калію (813 г, 7,25 моль) як останній реагент. Реакція була екзотермічною, приводячи до підвищення температури реакційної суміші до 70 °C. Потім реакційну суміш нагрівали до 120 °C протягом 2-3 годин. Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури. Додавали етилацетат (4 л) і водний розчин хлориду натрію (15 %, 2,5 л). Суміш перемішували протягом 20 хвилин. Водну фазу відокремлювали і проводили екстракцію іншою порцією етилацетату (2 л). Водну фазу відокремлювали і органічні фази об'єднували і промивали розчином хлориду натрію (15 %, 2,5 л). Органічну фазу відокремлювали, висушували за допомогою сульфату натрію і випаровували при зниженому тиску до червоної оливи, що містить 20-30 % NMP. Оливу розводили до подвоювання об'єму метанолом і суміш кип'ятили зі зворотним холодильником. Додавали більше метанолу, поки не одержували прозорий червоний розчин. Продукт поволі охолоджували до кімнатної температури при внесенні затравки. Продукт кристалізувався у вигляді не зовсім білих кристалів, їх виділяли фільтрацією, промивали метанолом і висушували при 40 °C у вакуумній печі до постійної маси.

Етил-4-гідрокси-4-(2-(4-толілсульфаніл)феніл)піперидин-1-карбоксилат

У реакторі при перемішуванні в атмосфері азоту суспендували 2-(4-толілсульфаніл)фенілбромід (600 г, 2,15 моль) в гептані (4,5 л). Додавали при кімнатній температурі 10 М BuLi в гексані (235 мл, 2,36 моль) протягом 10 хвилин. Виявили тільки невеликий екзотермічний ефект. Суспензію перемішували протягом 1 години при температурі навколишнього середовища і потім охолоджували до -40 °C. 1-Карбетокси-4-піперидон (368 г, 2,15 моль), розчинений в THF (1,5 л), додавали при такій швидкості, щоб підтримувати температуру реакції нижче -40 °C. Коли реакція дійшла до завершення, реакційну суміш нагрівали до 0 °C і додавали 1М HCl (1 л), підтримуючи температуру нижче 10 °C. Відокремлювали кислу водну фазу і проводили екстракцію етилацетатом (1 л). Органічні фази об'єднували і проводили екстракцію розчином хлориду натрію (15 %, 1 л). Органічну фазу сушили над сульфатом натрію і випаровували до напівкристалічної маси. Її суспендували в етиловому етері (250 мл) і відокремили фільтруванням. Висушували у вакуумній печі при 40 °C

до постійної маси.

Етил-4-(2-(4-толїлсульфанїл)фенїл)пїперидин-1-карбоксилат

Трифтороцтову кислоту (2,8 кг, 24,9 моль) і триетилсилан (362 г, 3,1 моль) завантажували в реактор з ефективною мішалкою. Етил-4-гїдрокси-4-(2-(4-толїлсуль-фанїл)фенїл)пїперидин-1-карбоксилат (462 г, 1,24 моль) додавали частинами через насипну лїйку. Реакція була слабо екзотермічною. Температура піднімалася до 50 °С. Після закінчення додавання реакційну суміш нагрівали до 60 °С протягом 18 годин. Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури. Додавали толуол (750 мл) і воду (750 мл). Виділяли органічну фазу і проводили екстракцію водної фази іншою порцією толуолу (750 мл). Органічні фази об'єднували, промивали розчином хлориду натрію (15 %, 500 мл) і висушували над сульфатом натрію. Сульфат натрію відокремлювали фільтруванням, фільтрат випаровували при зниженому тиску до червоної оливи, яку переробляли далі на наступній стадії.

Гїдробромїд 4-(2-(4-толїлсульфанїл)фенїл)пїперидину

Неочищений етил-4-(2-(4-толїлсульфанїл)фенїл)пїперидин-1-карбоксилат у вигляді червоної оливи з прикладу 3 змішували в реакторі з мішалкою з бромистоводневою кислотою в оцтовій кислоті (40 %, 545 мл, 3,11 моль). Суміш нагрівали при 80 °С протягом 18 годин. Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури. Під час охолодження продукт викристалізовувався. Через 1 годину при кімнатній температурі до реакційної суміші додавали етиловий етер (800 мл) і суміш перемішували протягом ще однієї години. Продукт відокремлювали фільтруванням, промивали етиловим етером і висушували у вакуумній печі при 50 °С до постійної маси.

Приклад 1с. Перекристалізація солі HBr сполуки I

Суміш з 10,0 г солі HBr сполуки I, наприклад, одержаної так, як описано вище, нагрівали для кип'ятіння із зворотним холодильником в 100 мл H₂O. Суміш ставала прозорою і повністю розчинялася при 80-90 °С. До прозорого розчину додавали 1 г активованого вугілля і продовжували кип'ятіння із зворотним холодильником протягом 15 хвилин, перш ніж профільтрувати і залишити для спонтанного охолодження до кімнатної температури. Під час охолодження відбувалося осадження білої твердої речовини і суспензію перемішували протягом 1 години при кімнатній температурі. Фільтрацією і висушуванням у вакуумі при 40 °С протягом ночі одержували 6,9 г (69 %) кислотнo-адитивної солі HBr сполуки I. Дивися XRPD на фігурі 1. Елементний аналіз: 3,92 % N, 59,36 % C, 6,16 % H (теоретично: 3,85 % N, 59,34 % C, 6,09 % H).

Приклад 1d. Одержання маточних розчинів вільної основи

До суміші з 500 мл етилацетату і 200 мл H₂O додавали 50 г солі HBr сполуки I, одержуючи двофазну суспензію. До цієї суспензії додавали приблизно 25 мл конц. NaOH, що приводило до утворення прозорого двофазного розчину (pH вимірювали як 13-14). Розчин енергійно перемішували протягом 15 хвилин і відокремлювали органічну фазу. Органічну фазу промивали 200 мл H₂O, сушили над Na₂SO₄, фільтрували і випаровували у вакуумі при 60 °С, одержуючи вихід вільної основи у 38 г (99 %) у вигляді майже безбарвної оливи.

Розчиненням 10 г оливи і доведенням об'єму до 150 мл з використанням етилацетату одержували 0,235 М маточний розчин в етилацетаті, з якого використовували алїквоти по 1,5 мл (100 мг вільної основи).

Розчиненням 10 г оливи і доведенням об'єму до 100 мл з використанням 96 % об. EtOH одержували 0,353 М маточний розчин в EtOH, з якого використовували алїквоти по 1,0 мл (100 мг вільної основи).

Приклад 1e. Утворення солей з використанням маточних розчинів вільної основи

Дані алїквоти поміщали в пробїрки і при перемішуванні додавали відповідну кількість кислоти, як вказано в таблиці 1. Якщо кислота була рідкою, її додавали нерозчиненою, в інших випадках її розчиняли в даному розчиннику перед додаванням. Після змішування і осадження перемішування продовжували протягом ночі і осад збирали фільтрацією. Перед висушуванням у вакуумі при 30 °С відбирали невеликий контрольний зразок і висушували при кімнатній температурі без вакууму. Цю процедуру включали для тестування сольватів. Деякі результати представлені в таблиці 1. Рентгенограми XRPD показані на фігурах 1-22, а вибрані положення піків наведені в таблиці 2. У таблиці 3 показані розчинності сполук за цим винаходом у воді разом з pH одержаного насиченого розчину. У колонці "осад" показано, чи є осад, виділений після визначення розчинності, ідентичним розчиненій сполуці, що є показником формування гїдратів.

Таблиця 1

Кислота (основа:кислота)	Молярна маса (MW) (г/моль)	Кількість кислоти (мг або мкл)	Розчинник	CHN (експ.)	CHN (теор.)
Пальмітинова кислота, гексадеканова кислота 1:1	256,42	90,5	EtOAc	75,36 9,77 2,46	75,64 9,9 2,6
DL-молочна кислота, DL-2- гідрокси-пропіонова кислота 1:1	90,1	31,8	EtOAc	66,88 7,26 3,52	67,53 7,29 3,75
Адипінова кислота, 1,6- гександіова кислота 1:1	146,14	51,6	EtOAc	66,08 7,23 2,98	67,1 7,27 3,26
Адипінова кислота, 1,6- гександіова кислота 2:1	146,14	25,8	EtOAc	70,66 7,32 3,82	70,75 7,35 3,93
Фумарова кислота 1:1	116,01	40,9	EtOH	65,71 6,41 3,35	66,14 6,31 3,51
Глутарова кислота, 1,5- пентандіова кислота 1:1	132,12	46,6	EtOAc	66,09 6,97 3,2	66,48 7,03 3,37
Маленова кислота 1:1	104,1	36,7	EtOAc	65,04 6,53 3,54	65,09 6,5 3,62
Щавлева кислота 1:1	90,1	31,8	EtOH	64,28 6,41 3,61	64,32 6,21 3,75
Себацінова кислота, 1,8- октандіова кислота 2:1	202,02	35,6	EtOAc	71,79 7,86 3,58	71,83 7,86 3,64
Бурштинова кислота, 1,4- бутандіова кислота 2:1	118,1	20,8	EtOAc	65,65 6,86 3,4	65,80 6,78 3,49 (утворює сіль 1:1)
L-оксибурштинова кислота, L-2-гідроксибутандіова кислота 1:1, α	134,1	47,3	EtOAc	62,87 6,20 3,22	63,29 6,52 3,36
L-оксибурштинова кислота, L-2-гідроксибутандіова кислота 1:1, β	134,1	47,3	EtOH	62,99 6,66 3,13	63,29 6,52 3,36
D-винна кислота, D-2,3-дигідрокси-бутандіова кислота 1:1	150,1	53,0	EtOH	60,67 6,4 3,07	60,95 6,28 3,23
L-аспарагінова кислота 1:1	133,1	47,0	EtOH	59,31 6,7 7,1 (містить надлишок кислоти)	63,43 6,78 6,73
Глутамінова кислота 1:1	165,15	58,3	EtOH	56,38 6,88 7,35 (містить надлишок кислоти)	56,46 6,94 7,06 (для солі 1:1 і моногідрата кислоти 1:1)
Лимонна кислота 2:1	192,13	33,9	EtOAc	65,93 6,72 3,44	66,46 6,64 3,69
HCl/Et ₂ O 1:1	2M	176,4	EtOH		
Фосфорна кислота 1:1	14,7M	24,0	EtOAc	55,79 6,47 3,43	56,68 6,34 3,67

Таблиця 2

Вибрані положення рентгенівських піків ($^{\circ}2\theta$), 2:1 означає 2 основи на 1 кислоту.
Всі значення $\pm 0,1^{\circ}$

Пальмітат	7,00	16,34	22,73	28,21
Стеарат	6,70	15,52	21,81	28,91
Лактат	5,30	8,18	9,44	17,24
Гідрат лактату	11,67	16,70	18,25	21,76
Гідроксил-ізобутират	5,09	16,60	20,38	27,37
Сіль себацінової кислоти	7,18	12,53	21,11	24,19
Сіль адипінової кислоти 2:1	8,03	13,52	17,90	24,60
Сіль адипінової кислоти 1:1 α	9,33	14,01	18,72	20,63
Сіль адипінової кислоти 1:1 β	15,69	21,53	25,81	31,18
Глутарат 1:1	9,39	11,70	14,05	14,58
Сукцинат 1:1	11,74	14,33	17,75	26,84
Фумарат 1:1	8,90	11,47	19,25	22,33
Фумарат 2:1	8,49	12,48	17,78	23,97
Малеат 1:1	12,11	15,51	17,48	22,53
Малеат 1:1 гідрат	12,81	18,76	20,53	27,31
Малонат α	10,77	16,70	19,93	24,01
Малонат β	6,08	10,11	18,25	20,26
Аспартат	11,05	20,1	20,60	25,00
Гідрат аспартату	7,80	13,80	14,10	19,63
Глутамат	7,71	14,01	19,26	22,57
Оксалат	14,68	17,45	19,50	23,90
Малат 1:1 α	8,30	12,04	17,23	20,67
Малат 1:1 β	10,91	12,87	14,14	26,16
Гідрат малату	12,30	15,56	19,56	23,30
D-тарtrat (з EtOH)	5,08	17,18	19,42	22,10
Гідрохлорид	12,44	16,72	19,45	25,02
Гідробромід	6,08	14,81	19,26	25,38
Гідробромід 1-PrOH сольват	6,57	13,12	19,07	24,77

Таблиця 3

Кислота (основа:кислота)	Розчинність (мг/мл)	Одержаний pH	Осад
Пальмітинова кислота, гексадеканова кислота 1:1	0,4	8,6	=початок утворення
DL-молочна кислота, DL-2-гідроксипропіонова кислота 1:1	>150	6,1	=початок утворення (після випаровування)
Адипінова кислота, 1,6-гександіова кислота 1:1	2,5	4,0	Частково сіль 2:1
Адипінова кислота, 1,6-гександіова кислота 2:1	1,0	7,8	=початок утворення
Фумарова кислота 1:1	0,2	3,3	=початок утворення
Глутарова кислота, 1,5-пентадіова кислота 1:1	13	4,6	=початок утворення
Малонова кислота 1:1 (α)	5,2	4,0	=нова форма (β)
Щавлева кислота 1:1	1,1	2,7	=початок утворення
Себацінова кислота, 1,8-октандіова кислота 2:1	0,7	5,5	=початок утворення
Бурштинова кислота, 1,4-бутандіова кислота 2:1	2,0	4,0	Гідрат
L-яблучна кислота, L-2-гідроксибутандіова кислота 1:1, β	2,8	4,0	Гідрат
D-винна кислота, D-2,3-дигідроксибутандіова кислота 1:1	1,8	3,5	Гідрат

L-аспарагінова кислота 1:1	39	4,3	Гідрат
Глутамінова кислота 1:1	>35	4,6	-
Лимонна кислота 2:1	0,5	4,7	=початок утворення
Фосфорна кислота 1:1	6,0	2,0	?
HCl	4,5	6,8	=початок утворення
HBr	2,4	7,0	=початок утворення

Приклад 2A. Інгібування зворотного захоплення серотоніну (5-HT) і норадреналіну (NE)

Аліквоти досліджуваної сполуки і препарат кортикальних синапсом щура попередньо інкубували протягом 10 хв./37 °C, а потім додавали [³H]NE або [³H]5-HT (кінцева концентрація 10 нМ). Неспецифічне захоплення визначали у присутності 10 мкМ талсупраму або циталопраму, а загальне захоплення визначали у присутності буфера. Аліквоти інкубували протягом 15 хвилин при 37 °C. Після інкубації [³H]NE або [³H]5-HT, поглинені синапсом, відокремлювали фільтрацією через Unifilter GF/C, заздалегідь просочений в 0,1 % PEI, протягом 30 хвилин, з використанням програми Tomtec Cell Harvester. Фільтри промивали і підраховували в лічильнику Wallac MicroBeta.

При NET сполука I демонструє значення IC₅₀ 23 нМ. При SERT сполука I демонструє значення IC₅₀ 8 нМ.

Приклад 2B. Антагонізм стосовно 5-HT_{2A}

Сполуку I досліджували щодо афінності до рецепторів серотоніну і знайшли, що вони виявляють антагоністичний профіль з афінністю до рецепторів 5-HT_{2A} (K_i 54 нМ). Афінитет розраховували за рівнянням $Y=100/(1+10^{(X-\log IC_{50})})$, де Y позначає відсоток зв'язування, а X позначає концентрацію сполуки. 5 концентрацій сполуки (1, 10, 30, 100, 1000 нМ) використовували для обчислення значення IC₅₀. K_i обчислювали з рівняння Чена-Прусоффа $K_i=(IC_{50}/(1+([L]/K_d)))$. Афінність визначали на MDL Pharmaservices, номер за каталогом 271650.

У клітинах ссавців, що експресують рецептори 5-HT_{2A} людини, сполука I показала конкурентні антагоністичні властивості. Сполуки зв'язуються з рецепторами 5-HT_{2A} з K_i<100 нМ, і у функціональному аналізі сполуки, що є антагоністами 5-HT, викликають вивільнення Ca²⁺ з внутрішньоклітинних запасів з K_b 67 нМ. Аналіз Шилда виявив конкурентний антагонізм з K_b 100 нМ.

Експеримент проводили таким чином. За 2 або 3 доби перед експериментом клітини CHO, що експресують 250 фмоль/мг рецепторів 5-HT_{2A} людини, поміщали у планшет зі щільністю, достатньою для одержання моноконфлюентного шару на день експерименту. Клітини завантажували барвником (Ca²⁺-набір від Molecular Devices) протягом 60 хвилин при 37 °C в інкубаторі з 5 % CO₂ при 95 % вологості. Базовий рівень флуоресценції відстежували на зчитувачі флуоресцентного зображення планшетів або FLIPR³⁸⁴ від Molecular Devices (Sunnyvale, CA) з довжиною хвилі збудження 488 нм і діапазоном випромінювання 500-560 нм. Інтенсивність лазера встановлювали на відповідний рівень для набуття базових значень приблизно 8000-10000 одиниць флуоресценції. Зміни у базовій флуоресценції повинні складати менше 10 %. Значення EC₅₀ оцінювали з використанням концентрацій досліджуваної сполуки, що збільшуються і перекривають щонайменше 3 порядки. Значення pA₂ оцінювали, перевіряючи повні криві залежності доза-відповідь стосовно 5-HT з чотирма різними концентраціями сполуки (150, 400, 1500 і 4000 нМ). Значення K_b також оцінювали, перевіряючи 2 порядки концентрацій досліджуваних речовин з EC₈₅ 5-HT. Досліджувані речовини додавали до клітин за 5 хвилин перед 5-HT. Значення K_i розраховували з використанням рівняння Чена-Прусоффа.

Приклад 2C. Антагонізм відносно 5-HT_{3A} рецептора

У ооцитах, що експресують гомомерні рецептори 5-HT_{3A} людини, 5-HT активує струми з EC₅₀ 2600 нМ. Вказаний струм може бути підданий антагоністичній дії класичними антагоністами 5-HT₃, такими як ондансетрон. Для ондансетрону в цій системі спостерігають значення K_i нижче 1 нМ. Сполуки за цим винаходом демонструють сильний антагонізм в низьких концентраціях (0,1 нМ - 100 нМ) (IC₅₀ ~ 10 нМ/K_b ~ 2 нМ) і агоністичні властивості, коли застосовуються у вищих концентраціях (100 - 100000 нМ) (EC₅₀ ~ 2600 нМ) з досягненням максимального струму приблизно у 70-80 % від максимального струму, викликаного власне 5-HT. У ооцитах, експресуючих гомомерні рецептори 5-HT_{3A} щура, 5-HT активує струми з EC₅₀ 3,3 мкМ. Експерименти проводили таким чином. Ооцити видаляли хірургічно у статевозрілої самки *Xenopus laevis* після анестезії за допомогою 0,4 % MS-222 протягом 10-15 хвилин. Потім ооцити розщеплювали при кімнатній температурі протягом 2-3 годин за допомогою 0,5 мг/мл колагенази (типу IA Sigma-Aldrich) в буфері OR2 (82,5 мМ NaCl, 2,0 мМ KCl, 1,0 мМ MgCl₂ і 5,0 мМ HEPES, pH 7,6). Ооцити, звільнені від фолікулярного шару, відбирали і інкубували протягом

24 годин в модифікованому сольовому розчині Барта [88 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 15 мМ HEPES, 2,4 мМ NaHCO₃, 0,41 мМ CaCl₂, 0,82 мМ MgSO₄, 0,3 мМ Ca(NO₃)₂], доповненому 2 мМ пірувату натрію, 0,1 од./л пеніциліну і 0,1 мкг/л стрептоміцину. Ідентифікували ооцити на стадії IV-IV і ін'єктували в них 12-48 нл вільної від нуклеази води, що містить 14-50 пг кРНК, що кодує рецептори 5-HT_{3A} людини, та інкубували при 18 °С до їх використання для зняття електрофізіологічних показань (1-7 діб після ін'єкції). Ооцити з експресією рецепторів 5-HT₃ людини поміщали в баню 1 мл і проводили перфузію буфером Рінгера (115 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ HEPES, 1,8 мМ CaCl₂, 0,1 мМ MgCl₂, pH 7,5). Клітини об'єднували з агаром, в який поміщені електроди 0,5-1 МОм, що містять 3 М KCl, і напругу фіксували на -90 мВ за допомогою підсилювача GeneClamp 500B. Проводили безперервну перфузію ооцитів буфером Зінгера, а лікарські засоби додавали в перфузат. Розчини агоніста 5-HT вводили протягом 10-30 секунд. Ефективність антагоністів рецептора 5-HT₃ досліджували за допомогою вимірювання концентрації-відповіді по відношенню до стимуляції 10 мкм 5-HT.

Приклад 2D. Антагонізм стосовно рецептора α_{1A}

Сполуки за цим винаходом тестували на афінність по відношенню до рецептора α_{1A} і знайшли, що вони демонструють антагоністичний профіль з середньою афінністю стосовно рецепторів α_{1A} (K_i=34 нМ).

На день експериментів мембрани (дивися нижче опис мембранного препарату) розморожували, гомогенізували в буфері з використанням гомогенізатора ultra turrax і розводили до бажаної концентрації (5 мкг/комірку ~ 5 мкг/900 мкл, зберігали на льоду до використання).

Експеримент починають змішуванням 50 мкл досліджуваної сполуки, 50 мкл [³H]-празозину і 900 мкл мембран і суміш інкубують протягом 20 хвилин при 25 °С. Неспецифічне зв'язування визначають у присутності 10 мкМ WB-4101, а загальне зв'язування визначають у присутності буфера. Після інкубації зв'язаний ліганд відокремлюють від незв'язаного шляхом фільтрації через Unifilter GF/B, заздалегідь просочений в 0,1 % PEI протягом 30 хвилин, з використанням програми Tomtec Cell Harvester (D4.2.4) для 96-коміркових планшетів. Фільтри промивають 3 рази 1 мл льодяного буфера, висушують при 50 °С і додають до фільтрів 35 мкл сцинтиляційної рідини/комірку. Зв'язану радіоактивність підраховують на лічильнику Wallac OY 1450 MicroBeta. Афінність обчислюють за рівнянням $Y=100/(1+10^{(X-\log IC_{50})})$, де Y позначає відсоток зв'язування, а X позначає концентрацію сполуки. Концентрації сполук, що перекривають 2 порядки, використовували для обчислення значення IC₅₀. K_i обчислювали за рівнянням Чена-Прусоффа $K_i=(IC_{50}/(1+([L]/K_d)))$.

У функціональному аналізі визначили, що сполука I є антагоністом викликаного адреналіном вивільнення Ca²⁺ з внутрішньоклітинних запасів, і функціональний аналіз показав, що сполуки були антагоністами.

Ці експерименти по суті проводили так, як описано нижче.

Всі клітини культивували в середовищі DMEM, доповненому 10 % BCS, 4 мМ L-глутаміну (або 2 мМ у разі COS-7) і 100 одиницями/мл пеніциліну плюс 100 мкг/мл стрептоміцину, при 37 °С в 5 % CO₂.

За двадцять чотири години до аналізів клітини CHO, що експресують рецептори альфа_{1A-7} людини, висівали в 384-коміркові мікротитрувальні планшети з чорними стінками, покриті полі-D-лізином. Відбирали культуральне середовище і клітини навантажували 1,5 мкМ барвника Fluo-4 в буфері для аналізу, складеному із збалансованого сольового розчину Хенка (138 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,3 мМ CaCl₂, 0,5 мМ MgCl₂, 0,4 мМ MgSO₄, 0,3 мМ KH₂PO₄, 0,3 мМ Na₂HPO₄, 5,6 мМ глюкози) плюс 20 мМ HEPES, pH 7,4, 0,05 % BSA і 2,5 мМ пробеніциду (50 мкл/комірку), протягом 1 години в 5 % CO₂ при 37 °С. Після видалення надлишку барвника клітини промивали в буфері для аналізу і робили їх шар при кінцевому об'ємі, що дорівнював 45 мкл/комірку (або 30 мкл/комірку для аналізу антагоністів). У разі оцінки антагоніста антагоніст або носій додавали в цей момент у вигляді аліквоти 15 мкл в 4 % DMSO-вмісному буфері при 4-кратній кінцевій концентрації (кінцевий DMSO=1 %) з подальшою інкубацією протягом 20 хвилин. Базовий рівень флуоресценції відстежували на зчитувачі флуоресцентного зображення планшетів або FLIPR™ від Molecular Devices (Sunnyvale, CA) з довжиною хвилі збудження 488 нм і діапазоном випромінювання 500-560 нм. Енергію збудження лазера регулювали так, що значення базового рівня флуоресценції складали приблизно 8000 відносних одиниць флуоресценції (RFU). Потім клітини стимулювали при кімнатній температурі агоністами, розведеними в буфері для аналізу (15 мкл), і вимірювали RFU з інтервалами в 1,5 секунди протягом періоду 2,5 хвилини. Для кожної комірки обчислювали максимальну зміну флуоресценції. Криві залежності концентрація-відповідь, одержані з максимальної зміни флуоресценції, аналізували за нелінійною регресією (рівняння Хіла). Для визначення антагоністичної активності після 20-хвилинної інкубації зі

сполукою (як вказано вище) додавали фіксовані концентрації стандартного агоніста серотоніну.

Приклад 2Е. Збільшення рівня дофаміну

Одноразова ін'єкція сполуки I доза-залежним чином збільшувала позаклітинні рівні DA у фронтальному кортексі щура. Сполука за цим винаходом при 8,9 мг/кг і 18 мг/кг підшкірно (s.c.) збільшувала рівні DA приблизно на 100 % і 150 %, відповідно, вище за базові рівні, як зображено на фігурі 23. Кількості обчислювали в розрахунку на вільну основу.

Метод

Використовували самців щурів Sprague-Dawley з первинною масою 275-300 г. Тварин помістили в контрольованих умовах при 12-годинному циклі світло/темрява при постійній температурі навколишнього середовища (21 ± 2 °C) і вологості (55 ± 5 %) з їжею і водопровідною водою, доступними за бажанням. Для експериментів з обробкою протягом трьох діб використовували осмотичні мінінасоси (Alzet, 2 ML 1). Насоси заповнювали в асептичних умовах та імплантували підшкірно з анестезією севофлурансом. Експерименти проводили з встановленими мінінасосами. Зразки крові для вимірювання рівнів досліджуваної сполуки в плазмі після 3 діб обробки збирали в кінці експериментів.

Хірургічні операції і експерименти з мікродіалізу

Проводили анестезію тварин за допомогою гіпнорму/дормікуму (2 мл/кг), і внутрішньомозкові напрямні канюлі (CMA/12) стереотаксично імплантували в гіпокамп, направляючи діалізний наконечник у вентральний гіпокамп (координати: 5,6 мм спереду брегми, латерально - 5,0 мм, 7,0 мм вентрально у бік твердої мозкової оболонки) або у фронтальний кортекс (координати: 3,2 мм спереду брегми; латерально, 3,0 мм; 4,0 мм вентрально у бік твердої мозкової оболонки). Анкерні гвинти і акриловий цемент служили для фіксації напрямних канюль. Температуру тіла тварин відстежували за допомогою ректального зонда і підтримували при 37 °C. Щурам дозволяли відновитися після хірургічної операції протягом 2 діб, поміщаючи їх поодиночки в клітки. На день експерименту зонд для мікродіалізу (CMA/12, діаметр 0,5 мм, довжина 3 мм) вставляли через напрямну канюлю. Зонди сполучали через двоканальне поворотне з'єднання з насосом для мікроін'єкцій. Перфузію зонда для мікродіалізу профільтованим розчином Рінгера (145 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1,2 mM CaCl₂) починали незадовго до введення зонда в мозок і продовжували протягом усього експерименту при постійній витраті потоку 1 (1,3) мкл/хв. Після 180 хвилин стабілізації починали експерименти. Діалізати збирали кожні 20 (30) хвилин.

Після експериментів щурів убивали обезголовлюванням, їх мозок видаляли, заморожували і нарізували для верифікації розташування зонда.

Аналіз діалізатів

Концентрацію дофаміну в діалізатах аналізували за допомогою ВЕРХ з використанням електрохімічної детекції. Моноаміни розділяли обернено-фазовою рідинною хроматографією (ODS 150 × 3 мм, 3 мкМ). Дофамін: рухома фаза, що складається з 90 mM NaH₂PO₄, 50 mM цитрату натрію, 367 мг/л натрієвої солі 1-октансульфонової кислоти, 50 мкМ ЕДТА і 8 % ацетонітрилу (pH 4,0), при витраті потоку 0,5 мл/хв. Електрохімічні детекції здійснювали з використанням кулонометричного детектора; напругу встановлювали на 250 мВ (захисна комірка при 350 мВ) (Coulchem II, ESA).

Приклад 2F. Підвищення рівня ацетилхоліну

Експеримент розробили для оцінки впливу сполуки I на позаклітинні рівні ацетилхоліну в префронтальному кортексі щурів, що вільно рухаються.

Для експериментів використовували самців щурів Wistar (280-350 г; Harlan, Zeist, Нідерланди). Щурів розмістили поодиночки в пластикових клітках (30 x 30 x 40 см), і вони мали вільний доступ до їжі та води.

Проводили анестезію щурів з використанням ізофлурану (2 %, 400 мл/хв. N₂O, 400 мл/хв. O₂). Лідокан (10 % мас./об.) використовували для місцевої анестезії. Кожну тварину поміщали в стереотаксичну рамку (Kopf instruments, USA), і I-подібні зонди власного виготовлення (мембрана Hospal AN 69, 4 мм відкритої поверхні) вставляли в серединний префронтальний кортекс (mPFC) з використанням атласу мозку щура Paxinos and Watson (1982). Координати кінчика зонда були в mPFC [AP=3,4 мм, L=-0,8 мм, V=5,0 мм]. Потім зонд фіксували на черепі за допомогою стоматологічного цементу і гвинта. Флуніксин (1 мг/кг підшкірно (s.c.)) вводили як післяопераційний анальгетичний засіб.

Експерименти проводили через 24-48 годин після хірургічної операції. На день експерименту щурів сполучали за допомогою гнучких трубок РЕЕК з насосами для мікроперфузії (CMA 102) і проводили перфузію зондів для діалізу буфером Рінгера, що містить 147 mM NaCl, 3,0 mM KCl, 1,2 mM CaCl₂ і 1,2 mM MgCl₂, при витраті потоку 1,5 мкл/хв. Зразки мікродіалізу збирали з інтервалами 30 хвилин в міні-флакони, що містять 55 мкл 0,02 М мурашиної кислоти, для визначення рівня ацетилхоліну. Зразки збирали за допомогою

автоматичного колектора фракцій (CMA 142) і зберігали при -80°C до аналізу. Після завершення експериментів щурів убивали. Мозок видаляли і витримували в розчині параформальдегіду (4 % мас./об.). Положення кожного зонда верифікували гістологічно згідно з Paxinos and Watson (1982) за допомогою одержання коронарних зрізів мозку.

5 Досліджувану сполуку розчиняли в 10 % 2-ОН-пропіл-бета-циклодекстрині і введення здійснювали за допомогою підшкірних ін'єкцій об'ємів 5 мл/кг в різних дозах.

Концентрації ацетилхоліну визначали за допомогою ВЕРХ з детекцією за тандемною мас-спектрометрією (MS/MS).

10 Аліквоти (25 мкл) ін'єктували в колонку для ВЕРХ за допомогою автоматичного інжектора зразків (PerkinElmer Instruments, серія 200). Хроматографічне розділення проводили на аналітичній колонці з оберненою фазою 150 x 2,00 мм (4 мкм) (Phenomenex Synergy MAX-RP, Bester), захищеній захисною колонкою 4 x 2,0 мм (Phenomenex Synergy MAX-RP AJO-6073, Bester), де обидві колонки підтримували при температурі 30°C . Рухома фаза (ізократична) складалася з ультраочищеної води (UP), ацетонітрилу (ACN) і трифтороцтової кислоти (TFA) (UP:ACN:TFA=95,0:0,5:0,1 об./об./об. %). Рухому фазу пропускали через систему із витратою

15 потоку 0,300 мл/хв. насосом для ВЕРХ (PerkinElmer Instruments, мікронасос серії 200).

Аналізи РХ/МС (LC/MS) проводили з використанням системи API 4000 MS/MS, що складається з детектора API 4000 MS/MS і зв'язаного з ним пристрою для іонного розпилення Turbo Ion Spray (обидва від Applied Biosystems, Нідерланди). Збір даних проводили в режимі позитивної іонізації з напругою іонного розпилення, встановленою на 5,5 кВ, тиском газу в розпилювачі 50 фунтів на кв. дюйм (на шкалі SCIEX 0-90) з температурою зонда 600°C . Приладом управляли в режимі моніторингу множинних реакцій (MRM) для детекції ацетилхоліну (попередник 146,1 Да, продукт 86,8 Да). Енергія зіткнення складала 21,0 еВ, і тиск газу (азоту) при зіткненні підтримували при 7 (на шкалі SCIEX 0-12). Дані калібрували і оцінювали кількість з використанням системи даних Analysttm (Applied Biosystem, версія 1,2).

25 Два послідовні зразки після мікродіалізу із змінами менше 50 % брали як базові рівні і встановлювали за 100 %. Зміни концентрації ацетилхоліну виражали у відсотках від базового рівня у того ж самого суб'єкта. Дані наведені на фігурі 24.

Приклад 2G. Підвищення рівня ацетилхоліну

30 Експеримент розробили для оцінки впливу сполуки І на позаклітинні рівні ацетилхоліну в префронтальному кортексі і вентральному гіпокампі щурів, що вільно рухаються.

Використовували самців щурів Sprague-Dawley з первинною масою 275-300 г. Тварин розмістили в контрольованих умовах при 12-годинному циклі світло/темрява при постійній температурі усередині приміщення ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) і вологості ($55\pm 5\%$) з вільним доступом до їжі і водопровідної води.

Хірургічні операції і експерименти з мікродіалізу

40 Проводили анестезію щурів за допомогою гіпнорму/дормікуму (2 мл/кг) і внутрішньомозкові напрямні канюлі (CMA/12) стереотаксично імплантували в гіпокамп з метою досягнення положення кінчика діалізного зонда у вентральному гіпокампі (координати: 5,6 мм позаду брегми, латерально - 5,0 мм, 7,0 мм вентрально в бік твердої мозкової оболонки) або у фронтальному кортексі (координати: 3,2 мм спереду брегми; латерально, 0,8 мм; 4,0 мм вентрально в бік твердої мозкової оболонки). Анкерні гвинти і акриловий цемент використовували для фіксації напрямних канюль. Температуру тіла тварин відстежували за допомогою ректального зонда і підтримували при 37°C . Щурам дозволяли відновитися після хірургічної операції протягом 2 діб, поміщаючи їх поодиноч в клітки. На день експерименту зонд для мікродіалізу (CMA/12, діаметр 0,5 мм, довжина 3 мм) вставляли через напрямну канюлю.

45 Зонди сполучали через двоканальне поворотне з'єднання з насосом для мікроін'єкцій. Перфузію зонда для мікродіалізу профільтованим розчином Рінгера (145 мм NaCl, 3 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1,2 mM CaCl_2 , що містить 0,5 мкМ неостигміну) починали незадовго до вставки зонда в мозок і продовжували протягом усього експерименту при постійній витраті потоку 1 мкл/хв. Після 180 хвилин стабілізації починали експерименти. Діалізати збирали кожні 20 хвилин. Після експериментів щурів убивали, їх мозок видаляли, заморожували і нарізували для верифікації розташування зонда.

Аналіз ацетилхоліну в діалізаті

55 Концентрацію ацетилхоліну (ACh) в діалізатах аналізували за допомогою ВЕРХ з електрохімічною детекцією з використанням рухомої фази, що складається з 100 mM динатрій гідрофосфату, 2,0 mM октансульфонової кислоти, 0,5 mM хлориду тетраметиламонію і 0,005 % MB (ESA), pH 8,0. Передколонковий ферментний реактор (ESA), що містить імобілізовану холіноксидазу, видаляв холін із ін'єктованого зразка (10 мкл) перед розділенням ACh на аналітичній колонці (ESA ACH-250); витрата потоку 0,35 мл/хв., температура: 35°C . Після

аналітичної колонки зразок пропускали через післяколонковий твердофазний реактор (ESA), що містить іммобілізовану ацетилхолін-естеразу і холіноксидазу. Останній реактор перетворював ACh на холін, а потім холін на бетаїн і H_2O_2 . Останнього з них піддавали електрохімічній детекції з використанням платинового електроду (аналітична комірка: ESA, модель 5040).

5 Представлення даних

У експериментах з одноразовою ін'єкцією середнє значення для 3 послідовних зразків ACh, безпосередньо передуючих введенню сполуки, служили базовим рівнем для кожного експерименту, і дані переводили у відсотки від базового рівня (середні значення базових рівнів до ін'єкції, нормалізовані до 100 %). Дані представлені на фігурах 25a і 25b.

10 Дані, представлені на фігурі 24, показують несподівані падіння рівнів ацетилхоліну (дивися, наприклад, 8 мг/кг), які важко пояснити і які приписали похибці експерименту. Загалом, обидва набори даних з прикладу 2F і 2G показують одне і те ж, тобто залежне від дози збільшення позаклітинних рівнів ацетилхоліну в мозку. Очікується, що преклінічні виявлення переведуть в поліпшення когнітивних функцій при клінічних умовах, що використовуються, наприклад, для

15 лікування захворювань, що характеризуються порушенням когнітивних функцій, таких як, наприклад, у пацієнтів з хворобою Альцгеймера, у частково сприйнятливих до лікування пацієнтів, пацієнтів з порушенням когнітивних функцій тощо.

Приклад 3. Дія сполуки I на щурів із спонтанною гіпертензією - тваринна модель ADHD

Основні симптоми ADHD включають дефіцит уваги, гіперактивність і підвищену

20 імпульсивність. Використовували щурів із спонтанною гіпертензією (SHR) як тваринні моделі для дослідження розладу гіперактивності і дефіциту уваги (ADHD). Щури Wistar Kyoto (початкова лінія для SHR) служили як контрольні [Biol. Psychiatry. 57, 1239-47, 2005]. Для оцінки описаних вище симптомів щурів поміщали в умови, де їжа використовувалася як винагорода із затримкою, при оцінці показників їх поведінки з точки зору уваги і імпульсивності. Дефіцит уваги

25 оцінювали по збільшенню кількості натиснень на важіль на неправильній стороні. Імпульсивність оцінювали за показниками натиснень на важіль і обстежень камери, в якій давали винагороду, в стані неактивного важеля (OFF) в ході сеансу тестування без затримки винагороди, і в ході інтервалу затримки в сеансах тестування, що проводилися із затримкою винагороди. Гіперактивність оцінювали шляхом циркадної фіксації в інфрачервоних камерах.

30 Щури SHR і Wistar Kyoto не відрізнялися в значній мірі в навчанні по виконанню завдань. Крім того, дві групи щурів SHR і Wistar Kyoto, яким вводили носій, демонстрували однакову загальну мотивацію у пошуках їжі, що знаходило відображення в рівній кількості одержаних винагород. Щури SHR демонстрували деякий дефіцит уваги порівняно зі щурами Wistar Kyoto. При цьому імпульсивність значно підвищувалася у щурів SHR порівняно з щурами Wistar Kyoto,

35 а також спостерігалася гіперактивність.

Групи досліджуваних тварин: одна група щурів Wistar Kyoto як контрольні, одна група щурів SHR, яким вводили носій (негативний контроль), дві групи щурів SHR з періодичним введенням метилфенідату (2 мг/кг і 5 мг/кг, інтраперитонеально, референтні групи), одна група щурів SHR, яким постійно давали метилфенідат у складі питної води (доза, що досягається: ~10 мг/кг/день),

40 і дві групи щурів SHR з періодичним введенням сполуки I (5 мг/кг і 10 мг/кг вільної основи).

Методи: ситуативне тестування проводили в ході 20-годинних сеансів, де в кожній з кабін для проведення ситуативного тестування були два важелі і сусідні камери, в яких давали винагороду, з правої та лівої сторони від панелі важеля. Тварини мали доступ до їжі тільки при натисненні на важіль, тоді як рідина була доступною без обмеження. Тренінг і тестування

45 складалися з наступних фаз:

Фаза придбання навиків (не лікування)

(1) Обидва важелі були постійно активними (що вказувалося світловим сигналом). Натиснення на кожен важіль приводило до негайної появи нагороди в сусідній камері, де давали винагороду, що супроводжувалося одним світловим сигналом в приміщенні.

50 (2) Аналогічно етапу (1), за винятком того, що в даний період часу був активним лише один важіль, при цьому робили переключення з 5-хвилинним ритмом між лівою і правою сторонами. Світловий сигнал вказував на правильну сторону.

(3) Проводився аналогічно етапу (2), за винятком того, що важіль на правильній стороні ставав неактивним протягом 20 секунд з періодом в 20 секунд. Світловий сигнал на правильній

55 стороні вказував на стан важеля (активний (ON) або неактивний (OFF)).

Фаза тестування (в ході експерименту):

(1) Проводився аналогічно етапу (3) фази придбання навиків.

(2) Проводився аналогічно етапу (1), за винятком того, що після натиснення на важіль, у разі активного важеля, винагорода не з'являлася миттєво, а із затримкою в 5 секунд. Протягом цього

60 періоду часу відповідний світловий сигнал знаходився в стані "виключено" (OFF), а важіль був

встановлений в неактивне положення.

(3) Проводився аналогічно етапу (2), але інтервал затримки становив 10 секунд.

(4) Проводився аналогічно етапу (3), але інтервал затримки становив 20 секунд.

5 Сполука I в обох досліджуваних дозах (5 і 10 мг/кг, інтраперитонеально, вводилася за 30 хвилин до тестування) мала значний вплив на щурів SHR. Вказані ефекти не впливали на придбання навиків виконання завдання або на загальну мотивацію по пошуку їжі, але дефіцит уваги і імпульсивність зменшувалися разом з гіперактивністю, локомоторна активність доза-залежним чином пригнічувалася при моніторингу циркадної активності протягом 1 години, без пролонгованих ефектів. Репрезентативний графік, що демонструє вплив сполуки I на дефіцит
10 уваги і імпульсивність у щурів SHR, наведений на фіг. 26.

Метилфенідат не продемонстрував узгодженого впливу на ситуативну поведінку щурів; не було зменшення дефіциту уваги або імпульсивності. Періодичне введення метилфенідату помітно і доза-залежним чином погіршило ступінь гіперактивності у щурів SHR. Цей ефект тривав декілька годин. Постійне введення не міняло характеру активності з часом.

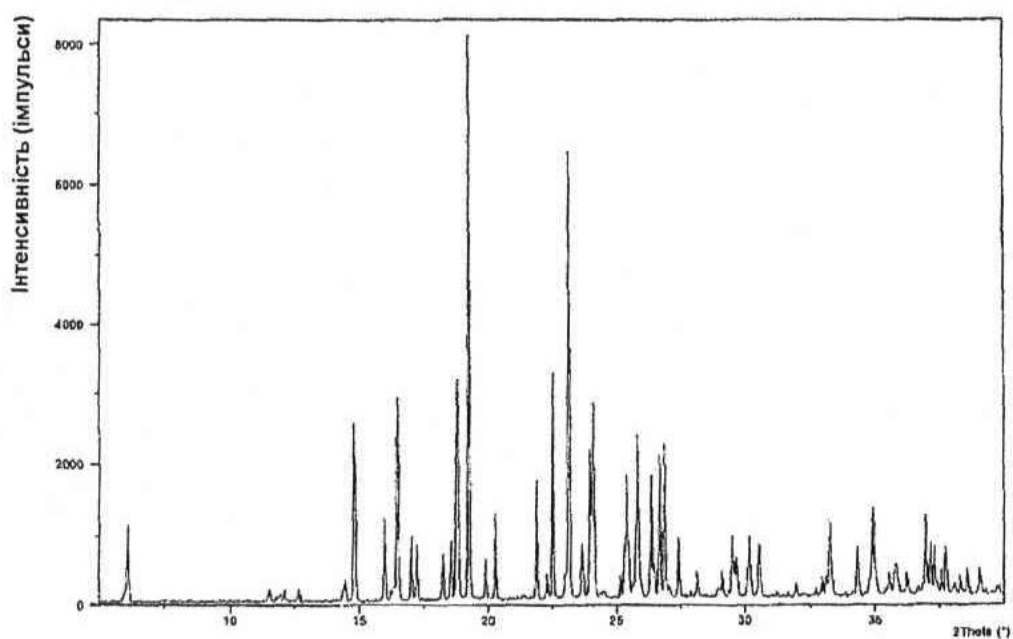
15 Результати, отримані в рамках описаної моделі, показують, що сполука I впливає на імпульсивність і увагу за механізмом, відмінним від механізму у разі метилфенідату. Відсутність впливу метилфенідату в рамках даної моделі може бути пов'язана з тим фактом, що, як було продемонстровано, метилфенідат ефективний у щурів, які не досягли дорослого стану, але не у дорослих щурів [Psychopharmacology (Berl), 193(2), 215-23, 2007].

20

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

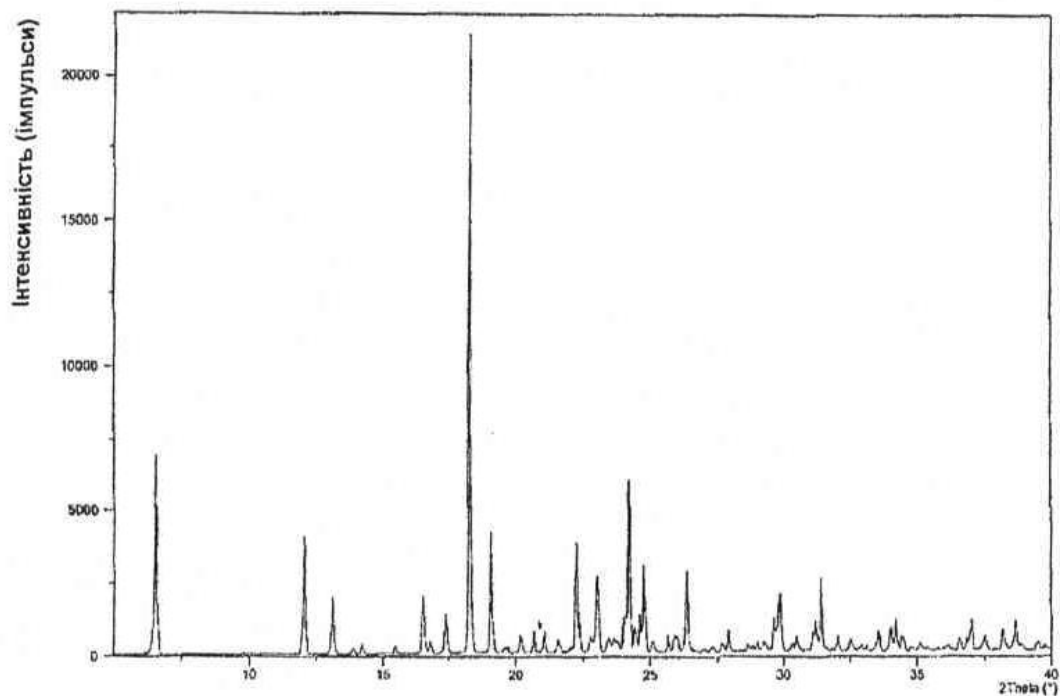
1. Спосіб лікування дефіциту уваги з гіперактивністю (ADHD), при якому вводять пацієнтові, який потребує цього, терапевтично ефективну кількість 4-[2-(4-метилфенілсульфаніл)феніл]піперидину і його кислотнo-адитивних солей (сполука I).
- 25 2. Спосіб за п. 1, де сполука I являє собою адитивну сіль HBr.
3. Спосіб за п. 2, де сполука I характеризується піками на порошковій рентгенограмі (XRPD) при приблизно 6,08, 14,81, 19,26 і 25,38°2θ.
4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, де сполуку I вводять в дозі 5-60 мг/день.
- 30 5. Застосування 4-[2-(4-метилфенілсульфаніл)феніл]піперидину і його кислотнo-адитивних солей (сполука I) для виробництва лікарського засобу для лікування дефіциту уваги з гіперактивністю (ADHD).
6. Застосування за п. 5, де сполука I являє собою адитивну сіль HBr.
7. Застосування за п. 6, де сполука I характеризується піками на порошковій рентгенограмі (XRPD) при приблизно 6,08, 14,81, 19,26 і 25,38°2θ.
- 35 8. Застосування за будь-яким з пп. 5-7, де вказаний лікарський засіб призначений для введення в дозі 5-60 мг/день.

XRPD солі HBr



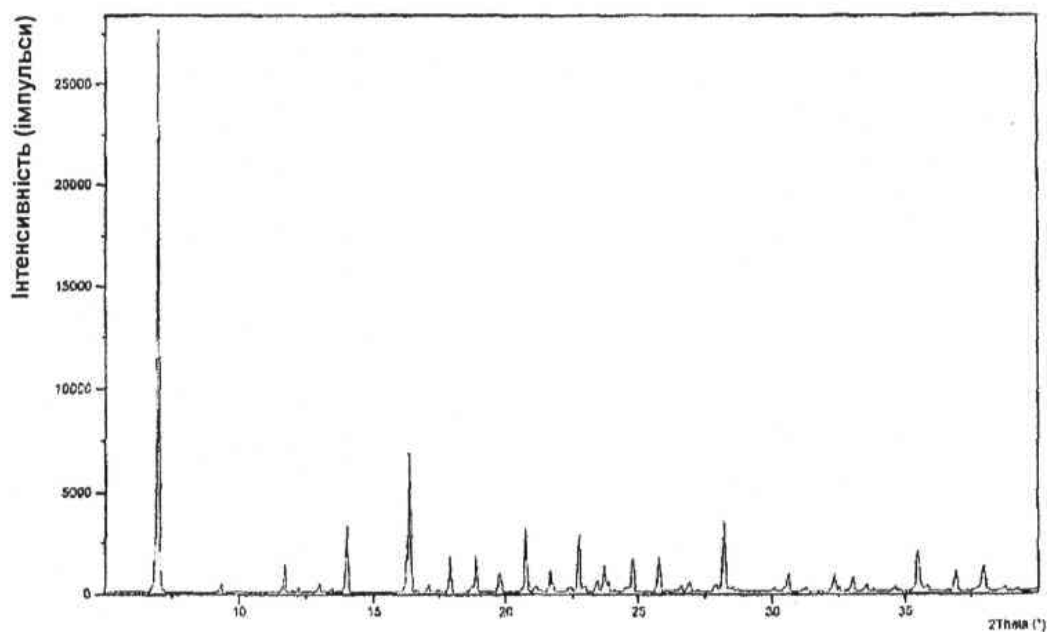
Фіг. 1

Сіль HBr, сольват



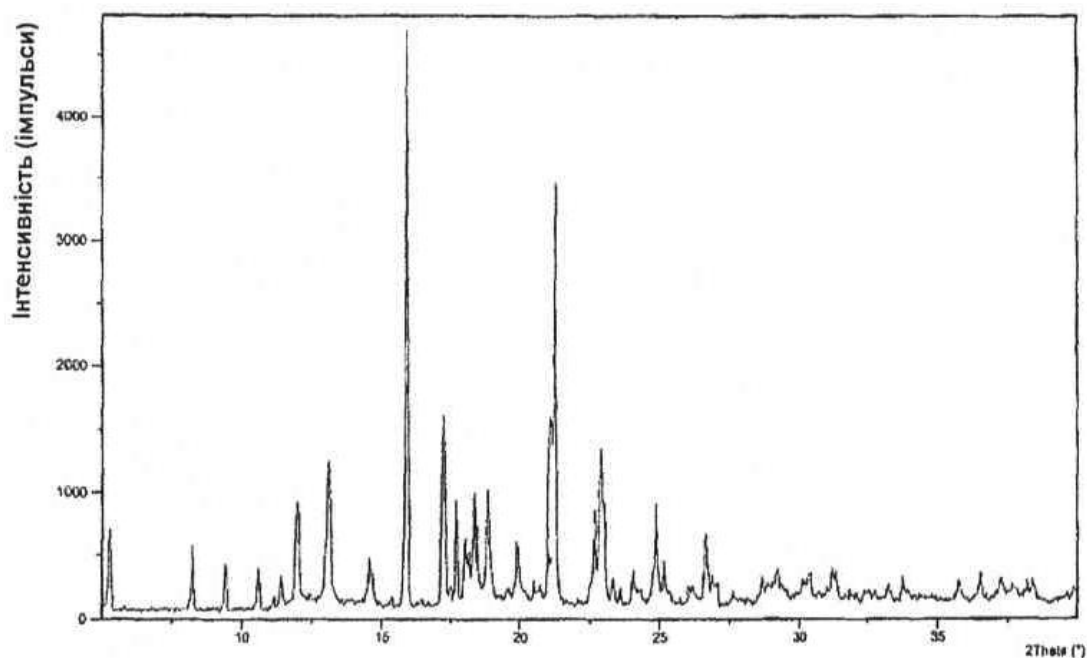
Фіг. 2

Сіль пальмітинової кислоти 1:1



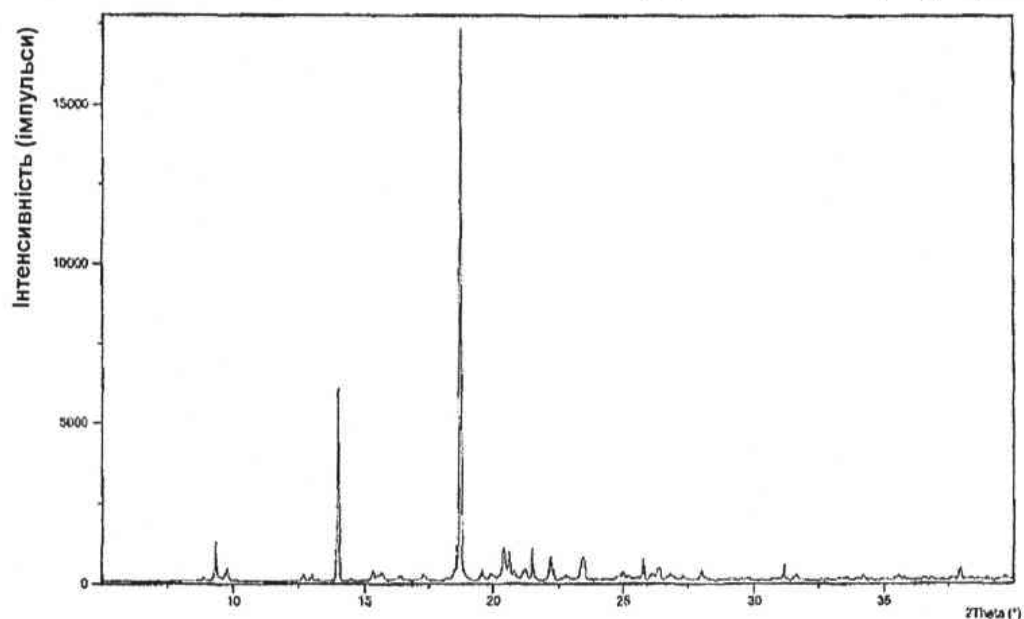
Фіг. 3

Сіль DL-молочної кислоти 1:1



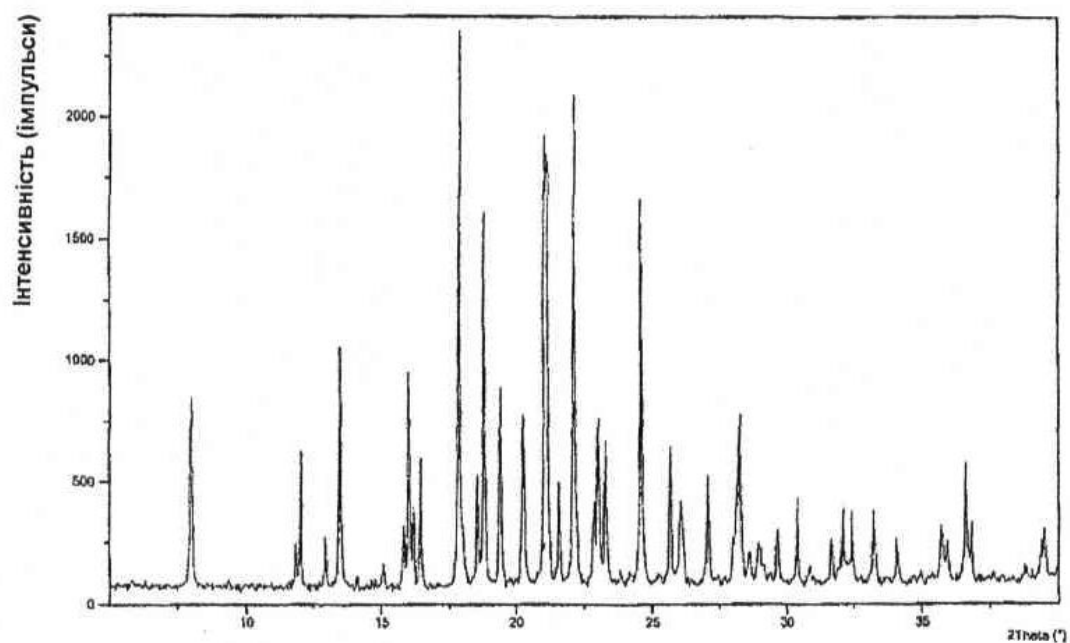
Фіг. 4

Сіль адипінової кислоти 1:1 (суміш α - та β -форми)



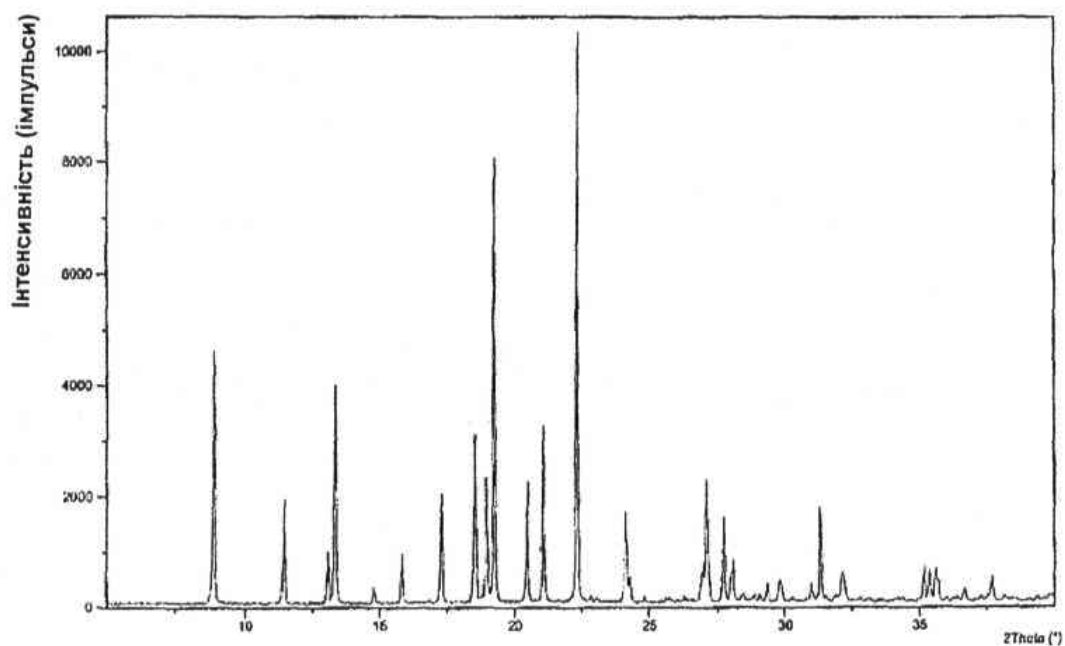
Фіг. 5

Сіль адипінової кислоти 2:1



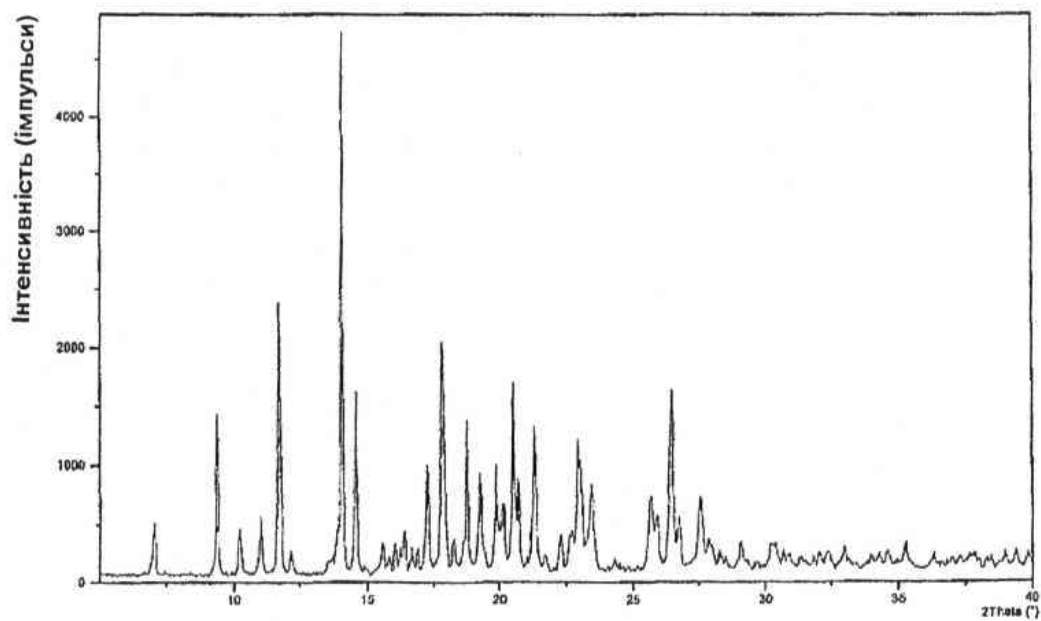
Фіг. 6

Сіль фумарової кислоти 1:1



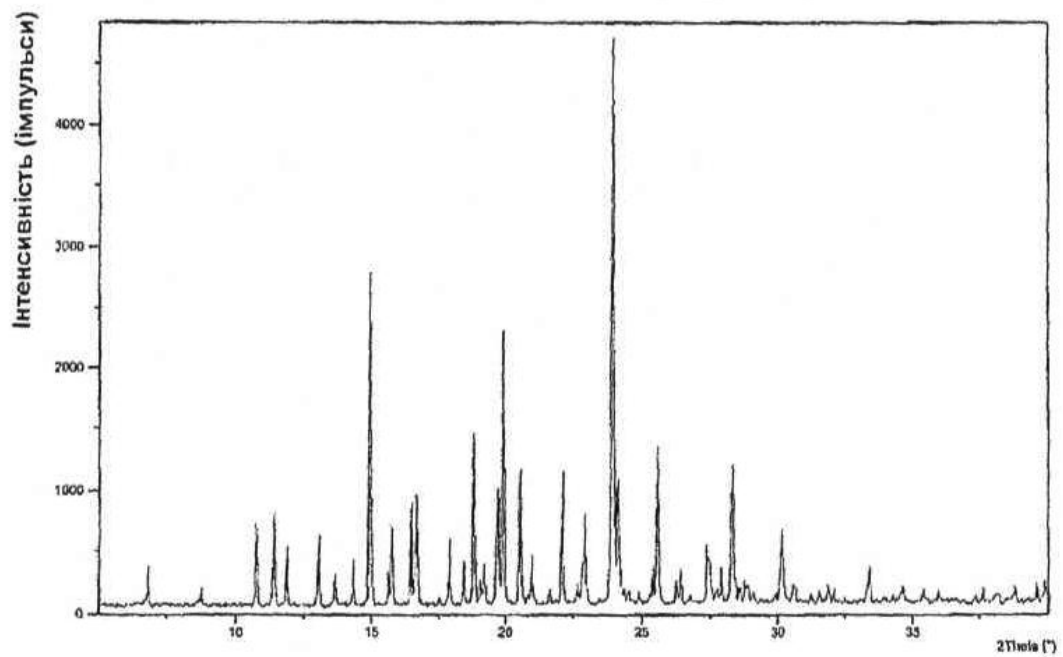
Фіг. 7

Сіль глутарової кислоти 1:1



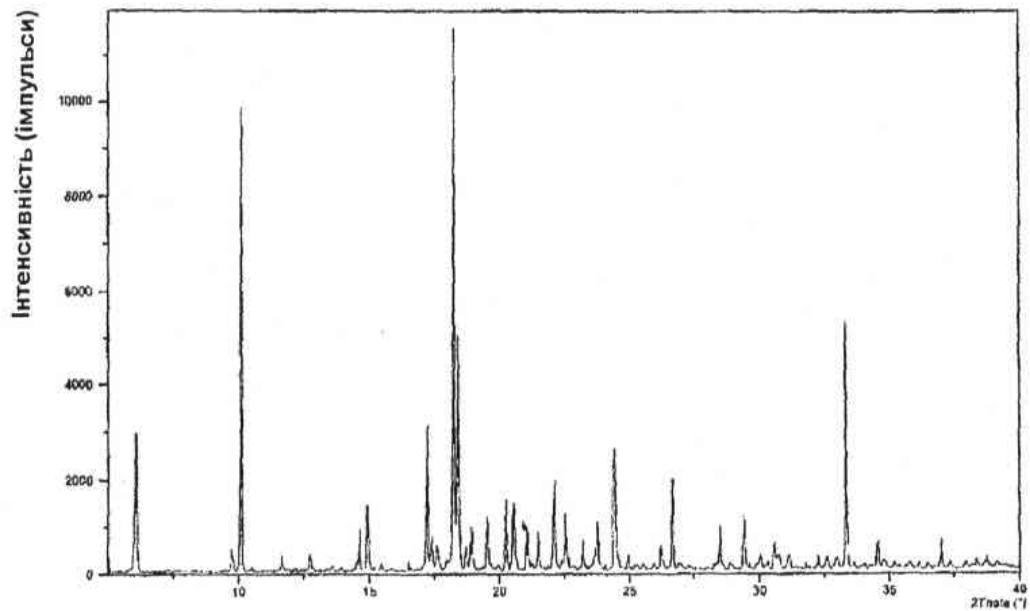
Фіг. 8

Сіль малонової кислоти 1:1, α -форма



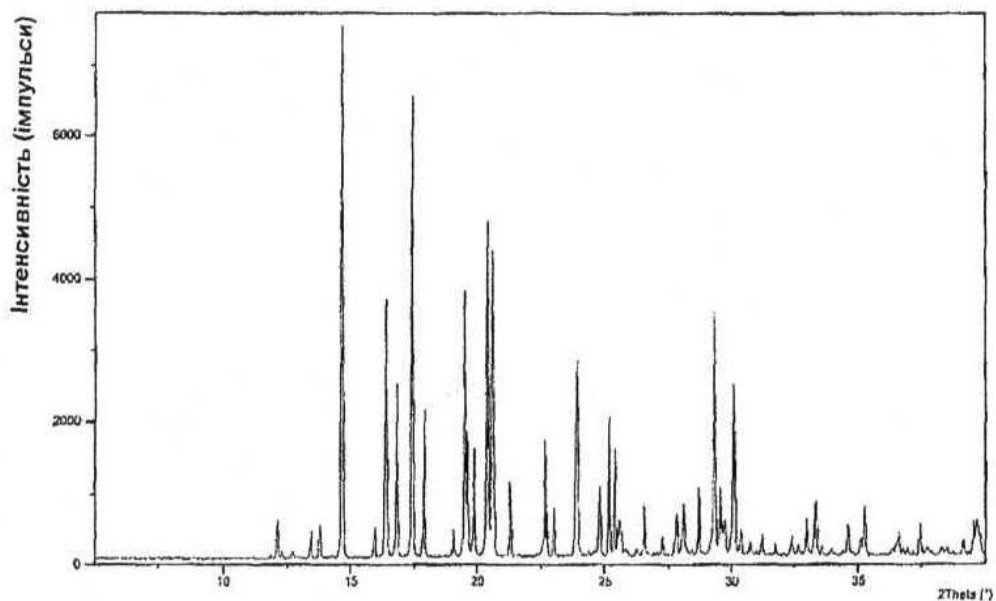
Фіг. 9

Сіль малонової кислоти 1:1, β -форма



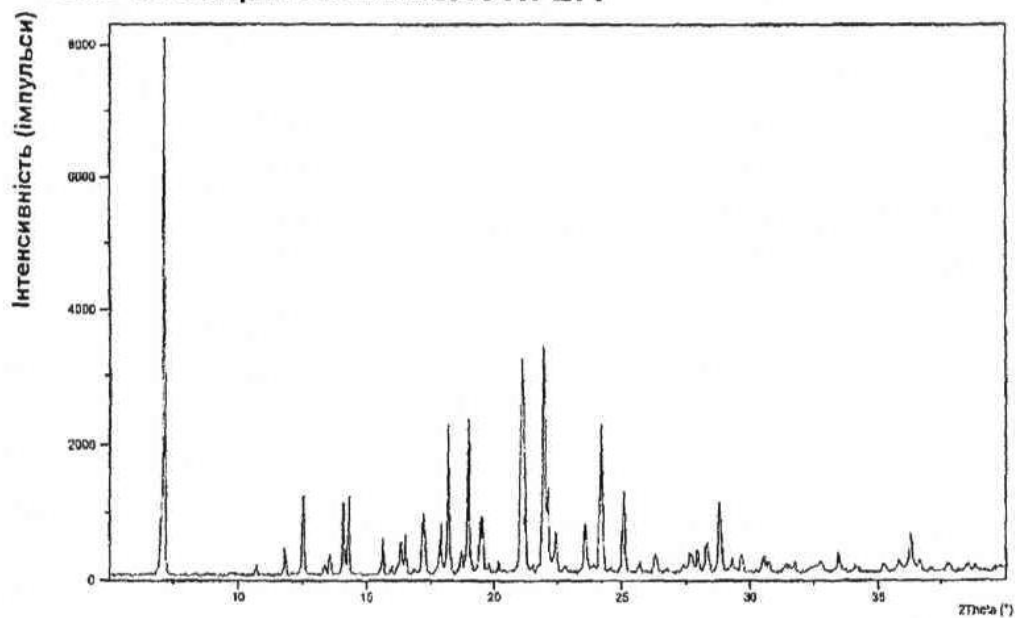
Фіг. 10

Сіль щавлевої кислоти 1:1



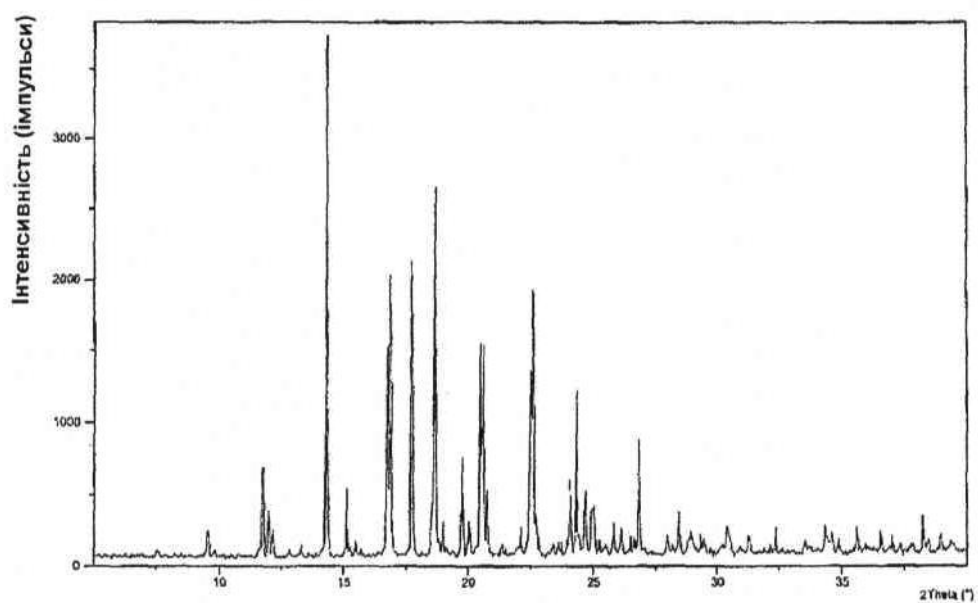
Фіг. 11

Сіль себацінової кислоти 2:1



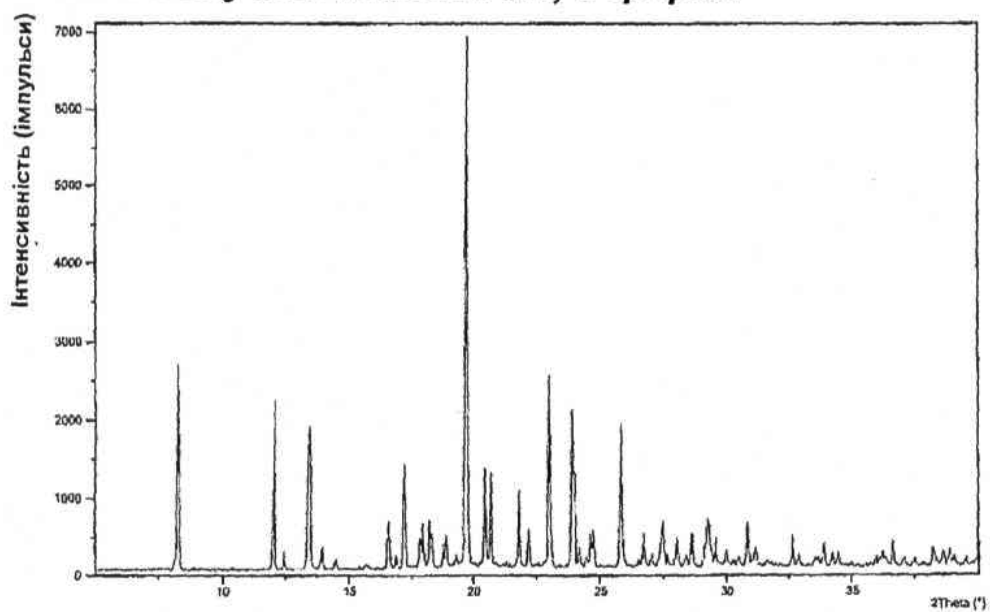
Фіг. 12

Сіль бурштинової кислоти 2:1



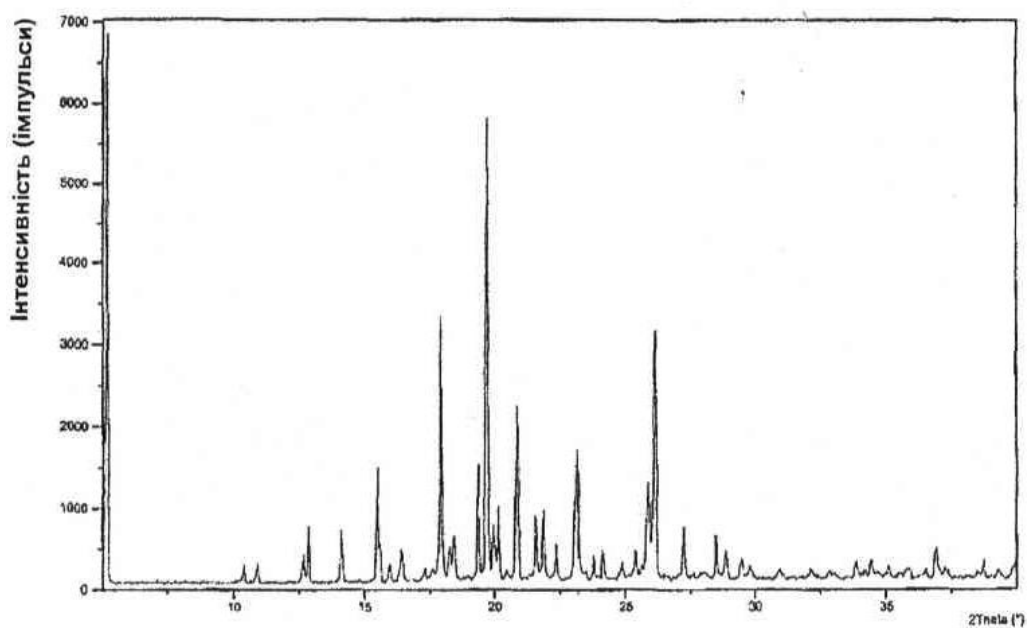
Фіг. 13

Сіль L-яблучної кислоти 1:1, α-форма



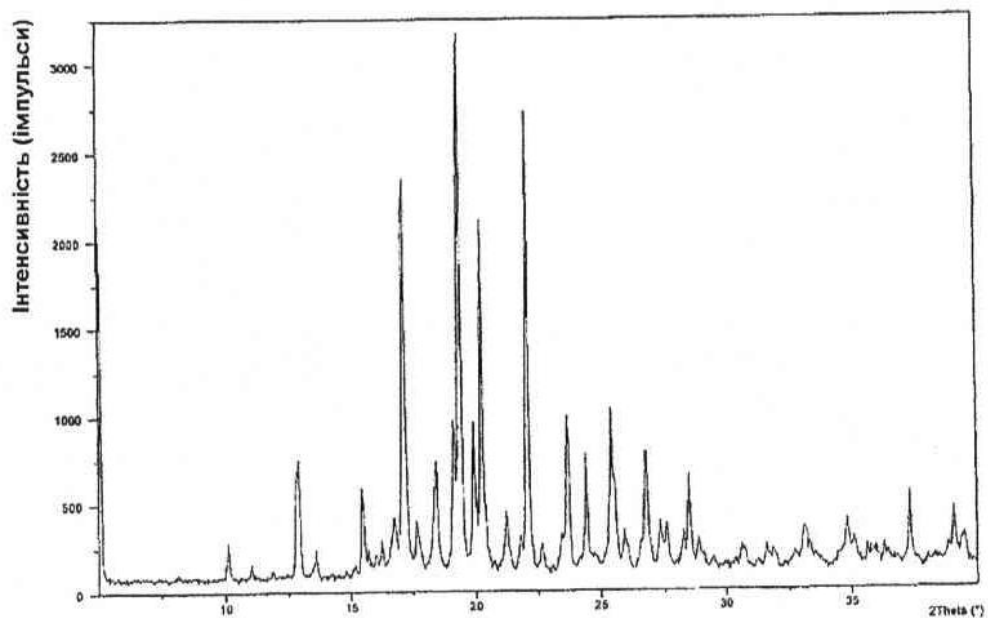
Фіг. 14

Сіль L-яблучної кислоти 1:1, β -форма



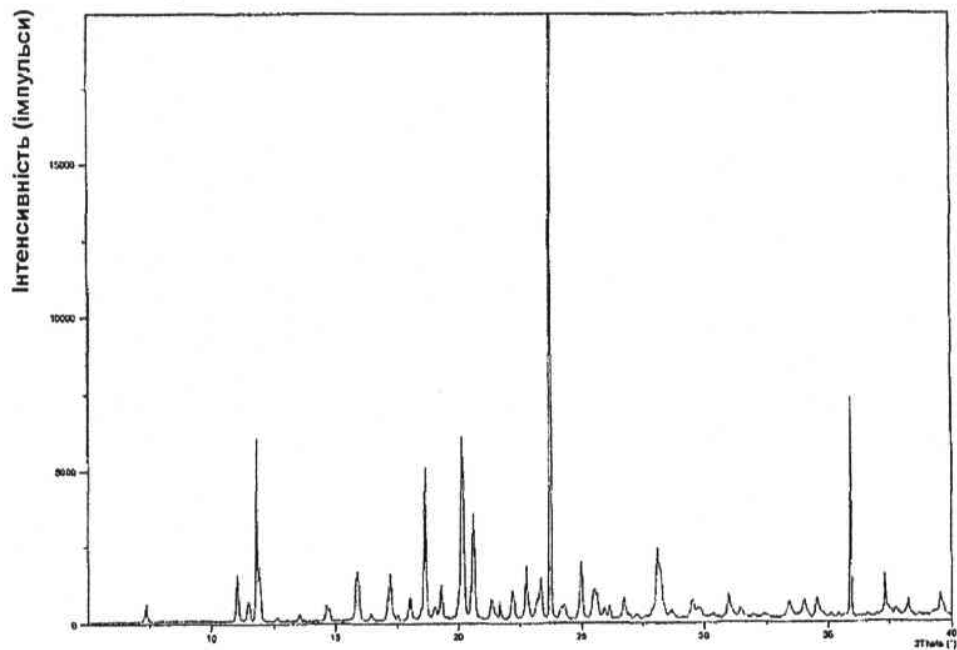
Фіг. 15

Сіль D-винної кислоти 1:1



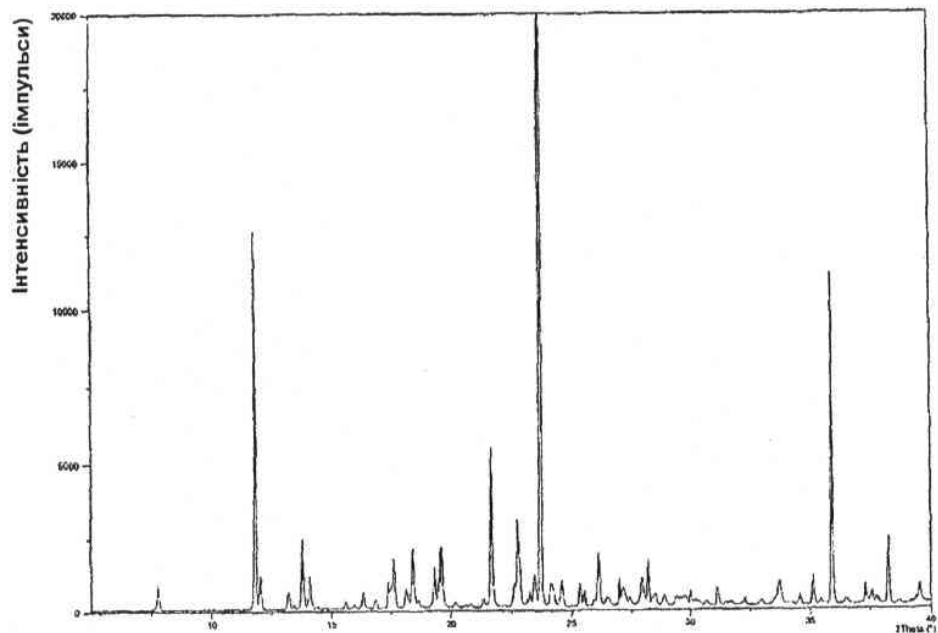
Фіг. 16

**Сіль L-аспарагінової кислоти 1:1 +
L-аспарагінова кислота**



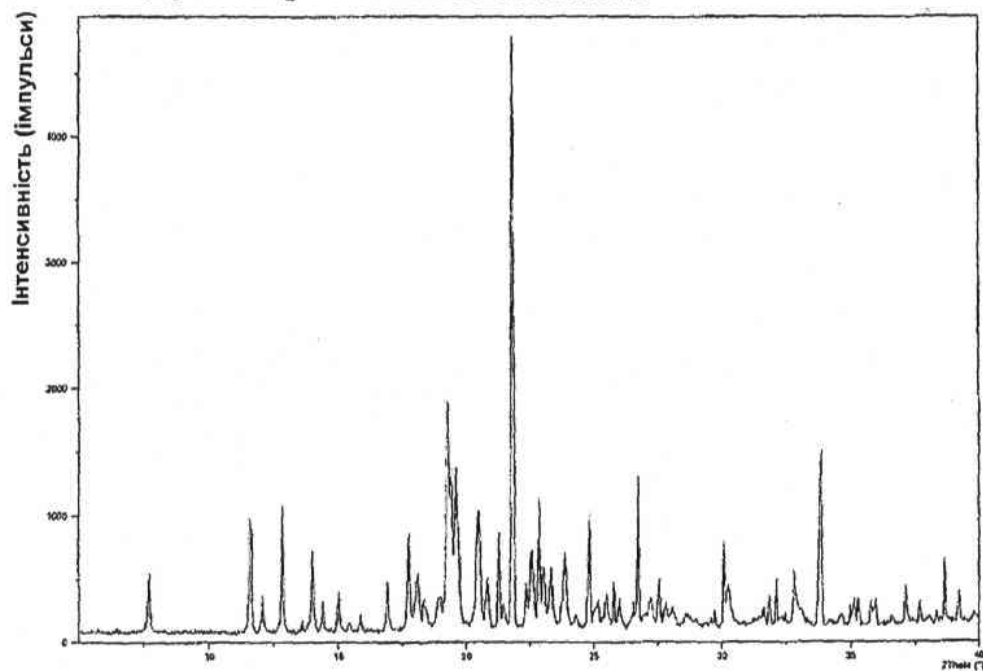
Фіг. 17

**Гідрат солі L-аспарагінової кислоти 1:1 +
L-аспарагінова кислота**



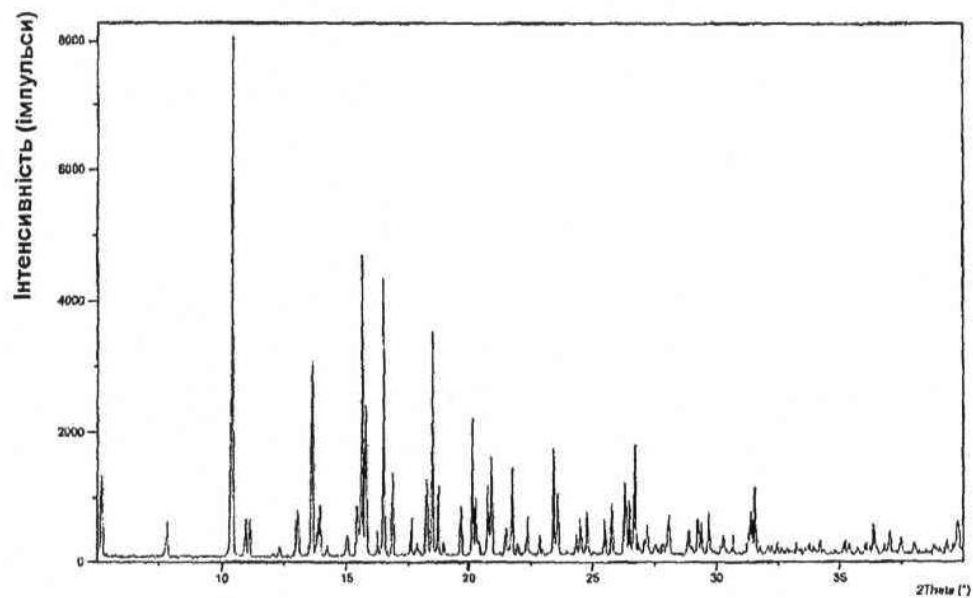
Фіг. 18

**Сіль глутамінової кислоти 1:1 +
моногідрат глутамінової кислоти**



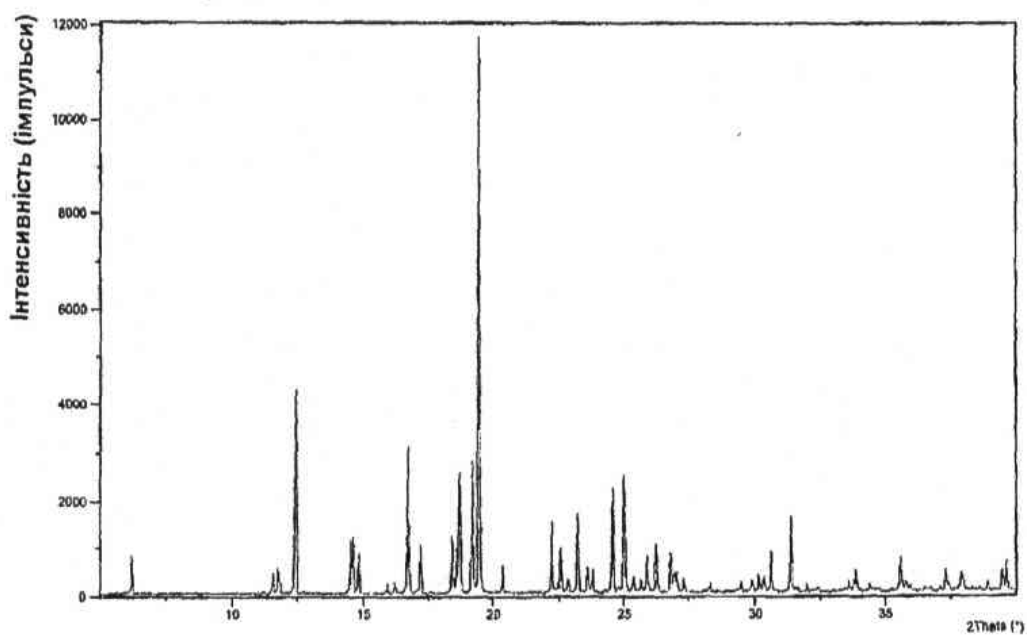
Фіг. 19

Сіль лимонної кислоти 2:1



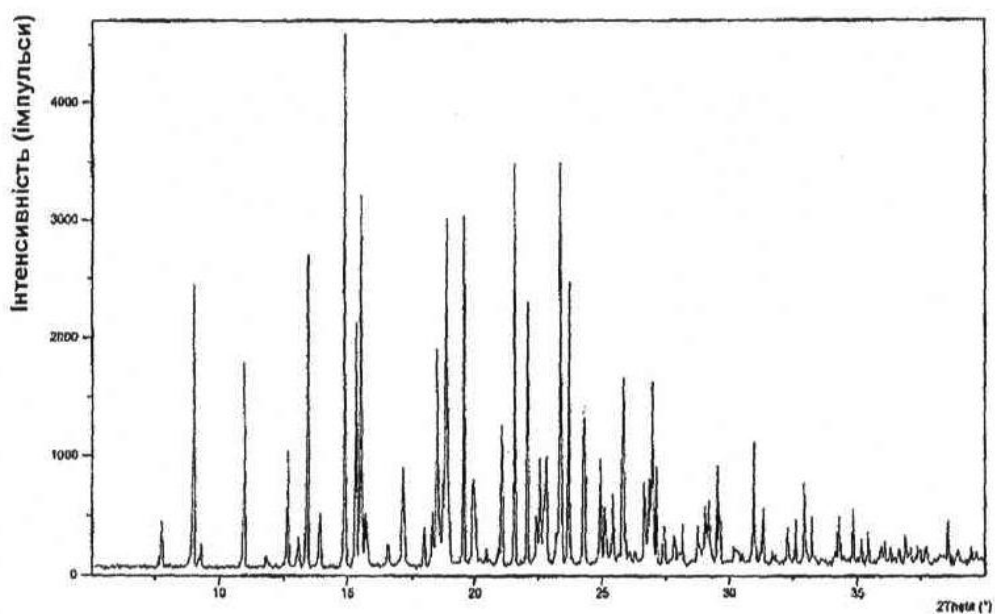
Фіг. 20

Гідрохлоридна сіль

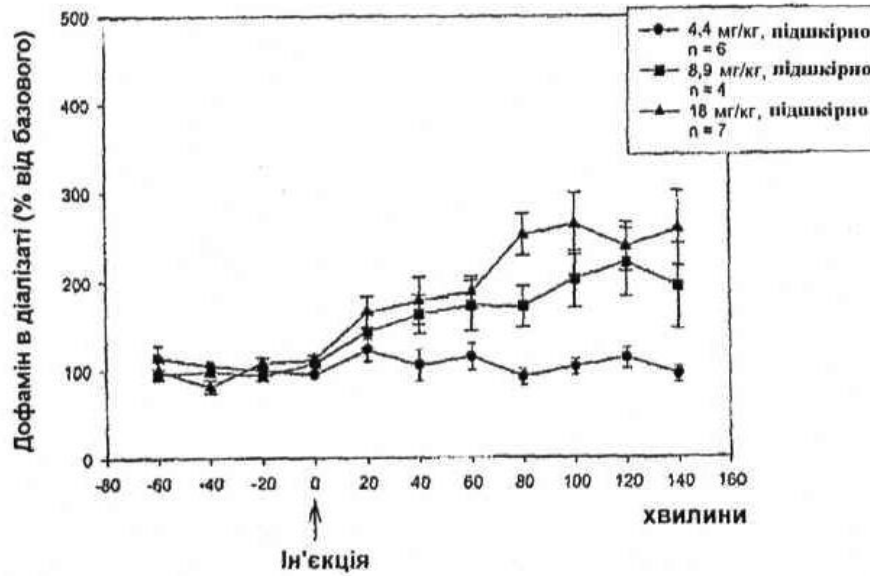


Фіг. 21

Сіль фосфорної кислоти 1:1

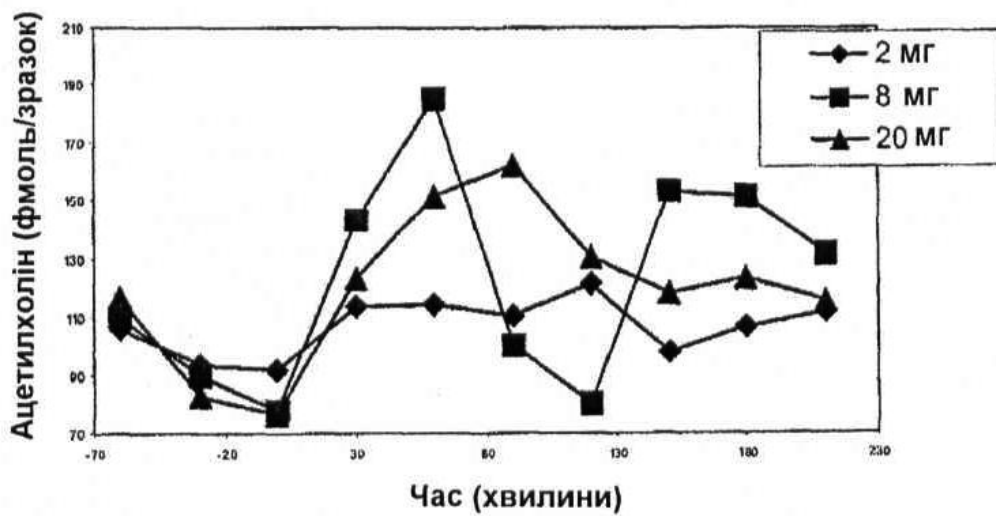


Фіг. 22



Фіг. 23

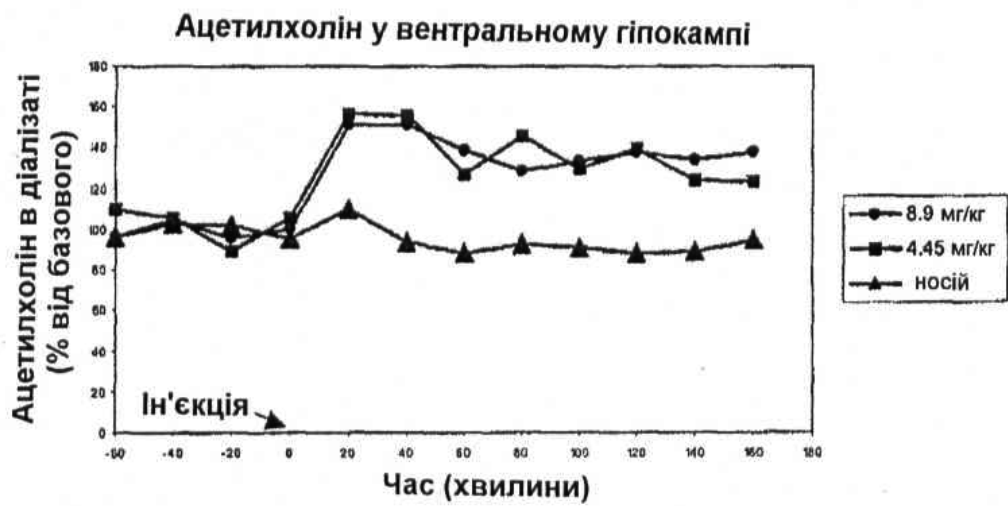
Позаклітинні рівні ацетилхоліну



Фіг. 24

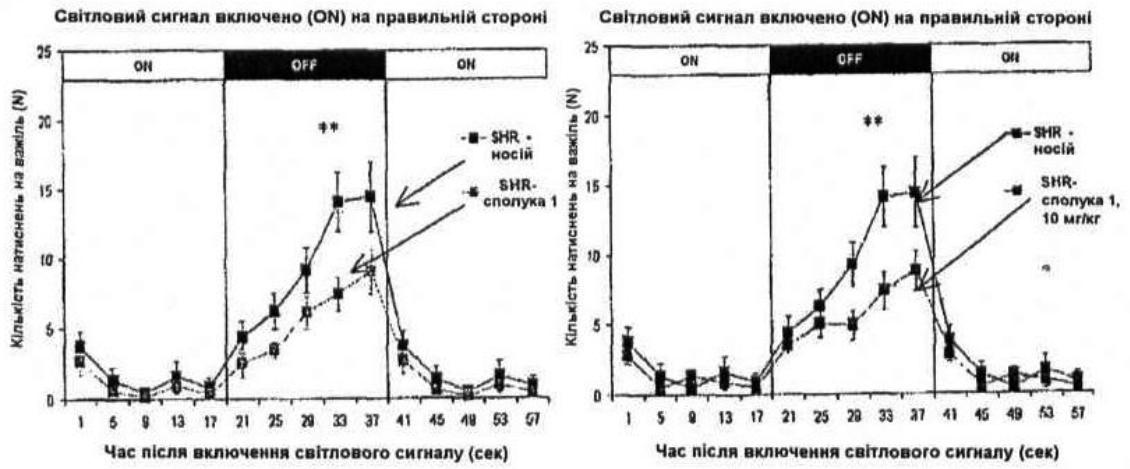


Фіг. 25а



Фіг. 25b

Кількість натиснень на важіль з неправильної
сторони (9-та - 12-та година випробування)



Фіг. 26

Комп'ютерна верстка Л.Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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